



등록특허 10-2777127



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월07일
(11) 등록번호 10-2777127
(24) 등록일자 2025년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/10 (2023.08)
- (21) 출원번호 10-2019-7006298
- (22) 출원일자(국제) 2017년08월02일
심사청구일자 2020년07월31일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월28일
- (65) 공개번호 10-2019-0038607
- (43) 공개일자 2019년04월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/045126
- (87) 국제공개번호 WO 2018/052556
국제공개일자 2018년03월22일

(30) 우선권주장
62/370,201 2016년08월02일 미국(US)
62/485,671 2017년04월14일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

KR1020070057839 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 22 항

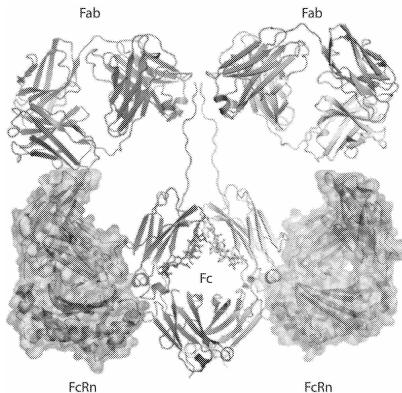
심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 조작된 폴리펩티드 및 그의 용도

(57) 요 약

Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예컨대 항체 분자 및 융합 단백질이 개시된다. 폴리펩티드는 장애를 치료, 예방 및/또는 진단하기 위해 사용될 수 있다. 특히, 표 1에 개시된 특정 돌연변이로부터 선택되는 하나의 또는 다수의 돌연변이를 포함하는 Fc 영역이 개시된다. 상기 돌연변이 중 일부는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 증가된 친화도를 초래하고, 상기 돌연변이 중 일부는 조작된 항체의 반감기를 연장하고, 또한 이펙터 기능에 영향을 미친다. 개시된 특정 돌연변이는 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, T256E, 또는 이들의 조합, 예를 들어 T256D/Q311V/A378V, H285N/T307Q/N315D, H285D/T307Q/A378V, T307Q/Q311V/A378V, T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V, 또는 T256D/T307R/Q311V이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/1027 (2013.01)

C07K 16/1081 (2013.01)

C07K 16/1282 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/524 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/72 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/734 (2013.01)

(72) 발명자

부스 브라이언

미국 02132 매사추세츠주 웨스트 록스베리 카스 스
트리트 99

나라얀 크리스틴

미국 02420 매사추세츠주 렉싱턴 메이플 스트리트
150

월라코트 앤드루 엠

미국 02186 매사추세츠주 밀턴 우드체스터 드라이
브 16

(56) 선행기술조사문현

KR1020110070914 A*

KR1020140114833 A*

WO2015175874 A2*

WO2015189249 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

명세서

청구범위

청구항 1

Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인은

- (i) T307Q, Q311V 및 A378V;
- (ii) T256D, Q311V 및 A378V;
- (iii) H285N, T307Q 및 N315D;
- (iv) H285D, T307Q 및 A378V;
- (v) T256D, N286D, T307R, Q311V 및 A378V; 또는
- (vi) T256D, H285D, T307R, Q311V 및 A378V

로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, Fc 영역 이외의 영역에서의 돌연변이를 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인 사이의 헌지 영역을 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 단리된 폴리펩티드인 폴리펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 합성 폴리펩티드인 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체 분자인 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서, 중쇄 면역글로불린 가변 영역, 경쇄 면역글로불린 가변 영역, 또는 둘 다를 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 8

제1항에 있어서, 면역글로불린 사슬 또는 이의 항원 결합 단편인 폴리펩티드.

청구항 9

제6항에 있어서, 항체 분자는 키메라 항체 분자, 뮤린 항체 분자, 인간 항체 분자 또는 인간화 항체 분자인 폴리펩티드.

청구항 10

제1항에 있어서, 융합 단백질인 폴리펩티드.

청구항 11

제1항에 있어서, 폴리펩티드는 하기 특성:

- a) 참조 폴리펩티드에 비해, pH 6.0 내지 6.5에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 증가된 결합 친화도를 보유함;
- b) pH 7.0 내지 7.4에서의 FcRn에 대한 결합 친화도보다, pH 6.0 내지 6.5에서의 FcRn에 대한 결합 친화도가 더 높음;
- c) pH 6.0 내지 6.5에서 300 nM 이하의 해리 상수(K_d)로 FcRn에 결합함;
- d) pH 7.0 내지 7.4에서 50 nM 이상의 K_d 로 FcRn에 결합함;
- e) 참조 폴리펩티드에 비해 Fc γ 수용체에 대해 동일한 또는 증가된 결합 친화도를 보유함;
- f) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 열 안정성을 보유함;
- g) 참조 폴리펩티드에 비해 C1q에 대해 동일한 또는 증가된 결합 친화도를 보유함;
- h) 참조 폴리펩티드에 비해 TRIM21에 대해 동일한 또는 증가된 결합 친화도를 보유함;
- i) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 또는 증가된 이펙터 기능을 보유함;
- j) 참조 폴리펩티드에 비해 증가된 생체내 반감기를 보유함;
- k) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 또는 증가된, 시험관내, 생체외 또는 생체내에서의 생물학적 기능을 보유함;
- l) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 현상성(developability) 특징을 보유함;
- m) 참조 폴리펩티드에 비해 에피토프에 대해 동일한 또는 증가된 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 보유함; 또는
- n) 참조 폴리펩티드에 비해 점막 흡수를 증가시킴

중 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13개 또는 전부를 가지며,

폴리펩티드는 적어도, 특성 a), b); 및 특성 e), f), g), h) 또는 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 가지고,

참조 폴리펩티드가 야생형 Fc 영역, 또는
 PSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (서열 번호 1의 아미노산 121-330, 또는 Fc 넘버링에 따른 아미노산 238-447)의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 12

제1항에 있어서,

- (i) 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 pH 6.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화도가 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50배 증가되거나;
- (ii) 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 6.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화도가 pH 7.4에서의 결합 친화도보다 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 또는 50배 더 높거나;
- (iii) 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 6.0에서 250 nM 이하, 200 nM 이하, 150 nM 이하, 100 nM 이하, 50 nM 이하, 25 nM 이하, 10 nM 이하, 5 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.05 nM 이하, 0.02 nM 이하, 0.01 nM 이하, 25 nM 내지 0.1 nM, 20 nM 내지 0.5 nM, 15 nM 내지 1 nM, 10 nM 내지 5 nM, 또는 20 nM 내지 10 nM의 해리 상수(K_d)로 FcRn에 결합하거나;
- (iv) 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 7.4에서 60 nM 이상, 80 nM 이상, 100 nM 이상, 150 nM 이상, 200 nM 이상, 500 nM 이상, 50 nM 내지 500 nM, 또는 100 nM 내지 250 nM의 K_d 로 FcRn에 결합하거나;
- (v) 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 Fc γ RI, Fc γ RIIa/b 또는

Fc γ RIII 중 1, 2개 또는 전부에 대한 결합 친화도를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 Fc γ RI, Fc γ RIIa/b 또는 Fc γ RIII 중 1, 2개 또는 전부에 대한 결합 친화도를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5 배 증가시키거나;

(vi) 시프로 오렌지 검정(sypro orange assay)에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 응점을 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C 또는 10°C 이하만큼 증가시키거나 감소시키거나;

(vii) ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 C1q에 대한 결합 친화도를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 C1q에 대한 결합 친화도를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키거나;

(viii) ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 TRIM21에 대한 결합 친화도를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 TRIM21에 대한 결합 친화도를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키거나;

(ix) 참조 폴리펩티드에 비해 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP) 또는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN) 중 1, 2, 3개 또는 전부를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP) 또는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN) 중 1, 2, 3개 또는 전부를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키거나;

(x) 동물 모델에서 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 생체내 반감기가 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 증가되거나;

(xi) 참조 폴리펩티드에 비해 시험관내, 생체외 또는 생체내에서의 생물학적 기능을 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서의 생물학적 기능을 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키거나;

(xii) 참조 폴리펩티드에 비해 안정성, 용해도, 응집, 또는 발현 수준 중 1, 2, 3개 또는 전부를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 변경하거나;

(xiii) 참조 폴리펩티드에 비해 결합 친화도, 특이성 또는 둘 모두를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 결합 친화도, 특이성 또는 둘 모두를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키고/시키거나;

(xiv) 트랜스시토시스 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 접막 흡수를 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 증가시키고,

참조 폴리펩티드가 야생형 Fc 영역, 또는
 PSVFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (서열 번호 1의 아미노산 121-330, 또는 Fc 넘버링에 따른 아미노산 238-447)의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 약학 조성물 내에 존재하는 것인 폴리펩티드.

청구항 14

제13항에 있어서, 폴리펩티드는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물 내에 존재하는 것인 폴리펩티드.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 16

제15항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 17

제15항의 핵산 분자를 포함하는 단리된 세포.

청구항 18

제16항의 벡터를 포함하는 단리된 세포.

청구항 19

폴리펩티드의 생산을 허용하는 조건 하에서 제17항의 단리된 세포를 배양하여 폴리펩티드를 생산하는 단계를 포함하는, 폴리펩티드의 생산 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 폴리펩티드를 단리하거나 정제하는 단계를 추가로 포함하는 폴리펩티드의 생산 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, 폴리펩티드는 대상체에서의 장애의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물 내에 존재하는 것인 폴리펩티드.

청구항 22

대상체로부터의 세포 또는 샘플을 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폴리펩티드와 접촉시켜 세포 또는 샘플 내 표적 분자를 검출하는 단계를 포함하는, 세포 또는 샘플 내 표적 분자의 검출 방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2016년 8월 2일에 출원된 미국 가출원 제62/370,201호 및 2017년 4월 14일에 출원된 미국 가출원 제62/485,671호를 우선권으로 주장한다. 상기 출원들의 내용은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되고 그 전부가 본원에 참고로 포함된 서열 목록을 포함한다. 2017년 8

월 1일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P2029-7014WO_SL.txt로 명명되었고, 그 크기는 3,490 바이트이다.

배경 기술

[0005] 모노클로날 항체 치료법은 질병 관련 생물학적 분자와 특이적으로 상호작용할 수 있는 모노클로날 항체(mAb)를 수반하는 면역 요법의 한 종류이다. 최근 몇 년간, 치료용 항체가 표적화할 수 있는 질환 분야가 크게 확대되었으며, 미국 및 다른 많은 국가에서 많은 모노클로날 항체 및 항체 유도 제품이 치료 용도로 승인되었다. 모노클로날 항체 치료법은 예를 들어 감염성 질환, 암, 면역 질환, 장기 이식, 심혈관 질환 및 대사 질환을 비롯한 다양한 질환 또는 병태의 치료를 위해 현재 사용되거나 조사되고 있다.

[0006] 모노클로날 항체의 효능은 상이한 작용 메커니즘에 의해 달성될 수 있다(Suzuki *et al.* *J Toxicol Pathol.* 2015; 28(3): 133-139). 많은 치료용 항체는 그의 표적 분자 또는 세포의 병리생리학적 기능을 중화한다. 최근에는, 면역 검사점을 차단하는 모노클로날 항체가 내성 임상 반응을 일으킬 가능성이 있는 암 환자의 항암 면역을 강화하기 위해 사용되어 왔다. 특정 모노클로날 항체는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성 또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 촉발할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어, 방사성 동위원소, 독소 또는 다른 치료제 또는 진단제에 접합될 때 약물 전달 운반체로서 사용될 수 있다.

[0007] 다양한 생물학적 기능을 조절하는데 있어서의 모노클로날 항체 및 항체 유도 제품의 능력을 감안할 때, 장애의 치료, 예방 및 진단에 적합한 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 생성을 위한 새로운 접근법의 개발이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 적어도 부분적으로는, 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하고 본원에서 개시되는 하나 이상의 구조적 또는 기능적 특성을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자, 발현 벡터, 속주 세포, 조성물(예를 들어, 약학 조성물), 키트, 용기 및 상기 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 본원에서 개시되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 장애, 예컨대 본원에서 개시되는 장애 및 병태를 치료, 예방 및/또는 진단하기 위해 (단독으로 또는 다른 작용제 또는 치료 양상과 조합하여) 사용될 수 있다.

[0009] 한 측면에서, 본 개시내용은 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질을 특징으로 하고, 상기 폴리펩티드는 하기 특성 중 하나 또는 그 초과(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13개 또는 전부)의 특성을 갖는다:

[0010] a) 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 예를 들어 6.0 내지 6.5의 pH(예를 들어, pH 6.0)에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 증가된 결합 친화도(예를 들어, 감소된 해리 상수(K_d)), 예를 들어 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50배 증가된 결합 친화도를 보유함;

[0011] b) 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 7.0 내지 7.4(예를 들어, pH 7.4)에서의 FcRn에 대한 결합 친화도보다, pH 6.0 내지 6.5(예를 들어, pH 6.0)에서의 FcRn에 대한 결합 친화도(예를 들어, 보다 낮은 해리 상수(K_d))가 더 높으며, 예를 들어 결합 친화도가 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 또는 50배 더 높음;

[0012] c) 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 예를 들어 300 nM 이하, 예를 들어 250 nM 이하, 200 nM 이하, 150 nM 이하, 100 nM 이하, 50 nM 이하, 예를 들어 25 nM 이하, 10 nM 이하, 5 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.05 nM 이하, 0.02 nM 이하 또는 0.01 nM 이하, 예를 들어 25 nM 내지 0.1 nM, 20 nM 내지 0.5 nM, 15 nM 내지 1 nM, 10 nM 내지 5 nM, 또는 20 nM 내지 10 nM의 해리 상수(K_d)로, 예를 들어 pH 6.0 내지 6.5(예를 들어, pH 6.0)에서 고친화도로 FcRn에 결합함;

[0013] d) 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 예를 들어 50 nM 이상, 예를 들어 60 nM 이상, 80 nM 이상, 100 nM 이상, 150 nM 이상, 200 nM 이상, 500 nM 이상, 예를 들어 50 nM 내지 500 nM 또는 100 nM 내지 250 nM의 K_d 로, 예를 들어 pH 7.0 내지 7.4(예를 들어, pH 7.4)에서 저친화도로 FcRn에 결합함;

[0014] e) 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 Fc γ 수용체(Fc γ

RI, Fc γ RIIa/b 또는 Fc γ RIII 중 1, 2개 또는 전부)에 대해 동일한 결합 친화도를 갖거나, 결합 친화도를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도를 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킴;

[0015] f) 예를 들어 시프로 오렌지 검정(sypro orange assay)에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 열 안정성을 갖거나, 열 안정성을 실질적으로 변경하지 않음(예를 들어 융점을 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C 또는 10°C 이하로 증가시키거나 감소시킴);

[0016] g) 예를 들어 ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 C1q에 대해 동일한 결합 친화도를 갖거나, 결합 친화도를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도를 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킴;

[0017] h) 예를 들어 ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 TRIM21에 대해 동일한 결합 친화도를 갖거나, 결합 친화도를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도를 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킴;

[0018] i) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 이펙터 기능, 예를 들어 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP) 또는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN) 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2개 또는 전부)을 갖거나, 이펙터 기능을 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 이펙터 기능을 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킴;

[0019] j) 예를 들어 동물 모델에서 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 증가된 생체내 반감기, 예를 들어 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 증가된 반감기를 가짐;

[0020] k) 참조 폴리펩티드에 비해 시험관내에서, 생체외에서 또는 생체내에서 동일한 생물학적 기능을 갖거나, 생물학적 기능을 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 생물학적 기능을 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킴;

[0021] l) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 현상성(developability) 특징, 예를 들어 안정성, 용해도, 융집, 또는 발현 수준 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2개 또는 전부)을 갖거나, 현상성 특징을 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 현상성 특징을 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킴;

[0022] m) 참조 폴리펩티드에 비해 애피토프에 대한 동일한 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 갖거나, 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킴; 또는

[0023] n) 트랜스시토시스(transcytosis) 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 점막 흡수를, 예를 들어 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50배 증가시킴.

[0024] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 예를 들어 6.0 내지 6.5의 pH(예를 들어, pH 6.0)에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 증가된 결합 친화도(예를 들어, 감소된 해리 상수(K_d))), 예를 들어 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50배 증가된 결합 친화도를 갖는다.

[0025] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 7.0 내지 7.4(예를 들어, pH 7.4)에서의 결합 친화도보다, pH 6.0 내지 6.5(예를 들어, pH 6.0)에서의 FcRn에 대한 결합 친화도(예를 들어, 보다 낮은 해리 상수(K_d)))가 더 높으며, 예를 들어 결합 친화도가 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 또는 50배 더 높다.

[0026] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 예를 들어 50

nM 이하, 예를 들어 25 nM 이하, 10 nM 이하, 5 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.05 nM 이하, 0.02 nM 이하 또는 0.01 nM 이하, 예를 들어 25 nM 내지 0.1 nM, 20 nM 내지 0.5 nM, 15 nM 내지 1 nM, 10 nM 내지 5 nM, 또는 20 nM 내지 10 nM의 해리 상수(K_d)로, 예를 들어 pH 6.0 내지 6.5(예를 들어, pH 6.0)에서 고친화도로 FcRn에 결합한다.

[0027] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 예를 들어 50 nM 이상, 예를 들어 60 nM 이상, 80 nM 이상, 100 nM 이상, 150 nM 이상, 200 nM 이상, 500 nM 이상, 예를 들어 50 nM 내지 500 nM 또는 100 nM 내지 250 nM의 K_d 로, 예를 들어 pH 7.0 내지 7.4(예를 들어, pH 7.4)에서 저친화도로 FcRn에 결합한다.

[0028] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 $Fc\gamma$ 수용체($Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa/b$ 또는 $Fc\gamma RIII$ 중 1, 2개 또는 전부)에 대해 동일한 결합 친화도를 갖거나, 결합 친화도를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도를 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킨다.

[0029] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 시프로 오렌지 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 열 안정성을 갖거나, 열 안정성을 실질적으로 변경하지 않는다(예를 들어 용점을 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C 또는 10°C 이하로 증가시키거나 감소시킨다).

[0030] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 C1q에 대해 동일한 결합 친화도를 갖거나, 결합 친화도를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도를 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킨다.

[0031] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 TRIM21에 대해 동일한 결합 친화도를 갖거나, 결합 친화도를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도를 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킨다.

[0032] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 이펙터 기능, 예를 들어 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP) 또는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN) 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2개 또는 전부)을 갖거나, 이펙터 기능을 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 이펙터 기능을 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킨다.

[0033] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 동물 모델에서 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 증가된 생체내 반감기, 예를 들어 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 증가된 반감기를 갖는다.

[0034] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드에 비해 시험관내에서, 생체외에서 또는 생체내에서 동일한 생물학적 기능을 갖거나, 생물학적 기능을 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 생물학적 기능을 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킨다. 한 실시양태에서, 생물학적 기능은 억제(예를 들어, 중화) 활성을 포함한다. 한 실시양태에서, 생물학적 기능은 병원체, 예를 들어 바이러스, 박테리아 또는 진균의 억제(예를 들어, 중화)를 포함한다. 한 실시양태에서, 생물학적 기능은 항종양 활성을 포함한다. 한 실시양태에서, 생물학적 기능은 면역 반응의 억제를 포함한다. 한 실시양태에서, 생물학적 기능은 아고니스트 활성을 포함한다. 한 실시양태에서, 생물학적 기능은 면역 반응의 활성화 또는 회복을 포함한다.

[0035] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드에 비해 동일한 현상성 특징, 예를 들어 안정성, 용해도, 응집, 또는 발현 수준 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2개 또는 전부)을 갖거나, 현상성 특징을 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 현상성 특징을 (예를 들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킨다.

[0036] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드에 비해 에피토프에 대한 동일한 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 갖거나, 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 실질적으로 변경하지 않거나(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이하의 감소 또는 증가), 또는 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 (예를

들어, 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 50배) 증가시킨다.

[0037] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 트랜스시토시스 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 점막 흡수를, 예를 들어 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50배 증가시킨다.

[0038] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 특성 a) 또는 b)를 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 특성 a) 및 b)를 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 특성 a) 및 b) 중 하나 또는 둘 모두, 및 상기 특성 c) 및 d) 중 하나 또는 둘 모두를 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 특성 a) 및 b) 중 하나 또는 둘 모두, 및 상기 특성 e), f), g), h), 및 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 특성 a) 및 b) 중 하나 또는 둘 모두, 및 상기 특성 c) 및 d) 중 하나 또는 둘 모두를 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 특성 a) 및 b) 중 하나 또는 둘 모두, 및 상기 특성 c), d), j), k), l), m) 및 n) 중 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부를 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 폴리펩티드는 상기 특성 a) 및 b) 중 하나 또는 둘 모두, 및 상기 특성 e), f), g), h), 및 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부, 및 상기 특성 c), d), j), k), l), m) 및 n) 중 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부를 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 상기 특성 a), b), c) 및 d) 중 1, 2, 3개 또는 전부, 상기 특성 e), f), g), h) 및 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부, 및 상기 특성 j), k), l), m), 및 n) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 특성 a) 및 c) 중 하나 또는 둘 모두, 상기 특성 b) 및 d) 중 하나 또는 둘 모두, 상기 특성 e), f), g), h) 및 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부, 및 상기 특성 j), k), l), m), 및 n) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 갖는다.

[0039] 한 실시양태에서, 참조 폴리펩티드는 예를 들어 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 Fc 영역, 또는 서열 번호 1의 아미노산 서열에 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열을 포함하는, 돌연변이가 없으면 동일한 폴리펩티드이다.

[0040] 한 실시양태에서, 돌연변이는 CH₂ 도메인 내의 잔기에 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 CH₃ 도메인 내의 잔기에 존재한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CH₂ 도메인 내의 잔기에서의 적어도 하나의 돌연변이 및 CH₃ 도메인 내의 잔기에서의 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CH₂ 도메인 및/또는 CH₃ 도메인 이외의 영역 내의 잔기에서의 돌연변이를 추가로 포함한다.

[0041] 한 실시양태에서, 돌연변이는 CH₂ 도메인과 CH₃ 도메인 사이의 링커 영역의 입체형태를 변경하지 않거나, 실질적으로 변경하지 않는다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 예를 들어 표면 영역(20% 초과의 용매 접근 가능 영역을 갖는 아미노산 잔기에 의해 커버되는 영역으로 정의된 영역) 상에 소수성 또는 방향족 잔기의 클러스터(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 연속적인 잔기)를 도입하지 않는다.

[0042] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 분자, 예를 들어, 본원에서 설명되는 항체 분자이다.

[0043] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 IgG, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 IgG1이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 IgG4이다.

[0044] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 중쇄 면역글로불린 가변 영역, 경쇄 면역글로불린 가변 영역, 또는 둘 모두를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 2개의 중쇄 면역글로불린 가변 영역 및 2개의 경쇄 면역글로불린 가변 영역의 사량체를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 전장 항체 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 분자의 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)을 포함한다.

[0045] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 키메라 항체 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간화된 항체 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 항체 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 뮤린 항체 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 이중특이적 또는 다중특이적 항체 분자를 포함한다.

[0046] 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 융합 단백질, 예를 들어, 본원에서 설명되는 융합 단백질이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 단편(예를 들어, 기능적 단편)을 포함한다.

[0047] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 다음 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개 또는 전부)을 포함한다:

(i) FcRn과 상호작용하는 표면 영역(예를 들어, 20% 초과의 용매 접근 가능 영역을 갖는 아미노산 잔기에 의해 커버되는 영역으로 정의된 영역) 내의 잔기, 예를 들어 FcRn 접촉 잔기에서의 돌연변이;

(ii) Fc-FcRn 계면을 따른 말초 잔기인 잔기(예를 들어, Fc-FcRn 복합체에서 FcRn으로부터 7 옹스트롬 미만인

Fc 영역의 표면 상의 임의의 아미노산 잔기)에서의 돌연변이;

[0050] (iii) Fc-FcRn 결합에서 비접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이;

[0051] (iv) 250-나선, 예를 들어 P247, K248, D249, T250, L251 또는 M252 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 전부)을 포함하는 나선의 입체형태적 역동성(conformational dynamics)을 향상시키는 나선 접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이;

[0052] (v) 히스티딘의 pK를 조절하고/하거나 Fc-FcRn 계면을 따른 히스티딘의 도입인 돌연변이(예를 들어, Fc-FcRn 복합체에서 FcRn으로부터 7 용스트롬 미만인 Fc 영역의 표면 상의 임의의 아미노산 잔기의).

[0053] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i) 및 (ii)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i) 및 (iii)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i) 및 (iv)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (ii) 및 (iii)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (ii) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (iii) 및 (iv)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (iii) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (iv) 및 (v)를 포함한다.

[0054] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (ii) 및 (iii)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (ii) 및 (iv)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (ii) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (iii) 및 (iv)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (iv) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (iii) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (ii), (iii) 및 (iv)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (ii), (iii) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (iii), (iv) 및 (v)를 포함한다.

[0055] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (ii), (iii) 및 (iv)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (ii), (iii) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (ii), (iv) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (iii), (iv) 및 (v)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (ii), (iii), (iv) 및 (v)를 포함한다.

[0056] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 상기 (i), (ii), (iii), (iv) 및 (v)를 포함한다.

[0057] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 FcRn과 상호작용하는 표면 영역(예를 들어, 20% 초과의 용매 접근 가능 영역을 갖는 아미노산 잔기에 의해 커버되는 영역으로 정의된 영역) 내의 잔기, 예를 들어 FcRn 접촉 잔기의 돌연변이를 포함한다.

[0058] 한 실시양태에서, 돌연변이는 L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435, 또는 Y436으로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435, 또는 Y436으로부터 선택되는 잔기 중 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16개 또는 전부)에서의 다수의 돌연변이를 포함한다.

[0059] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 Fc-FcRn 계면을 따른 말초 잔기인 잔기(예를 들어, Fc-FcRn 복합체에서 FcRn으로부터 7 용스트롬 미만인 Fc 영역의 표면 상의 임의의 아미노산 잔기)에서의 돌연변이를 포함한다.

[0060] 한 실시양태에서, 돌연변이는 T256, H285, N286, T307, Q311, N315 또는 A378 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부)으로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256, H285, N286, T307, Q311, N315 또는 A378로부터 선택되는 잔기 중 2개 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부)에서의 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256D, H285N, N286D, T307Q, Q311V, N315D, 또는 A378V로부터 선택되는 하나 이상의(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부의) 돌연변이를 포함한다.

[0061] 한 실시양태에서, 돌연변이는 T256, Q311 또는 A378로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256, Q311 또는 A378로부터 선택되는 2개 또는 전부의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256D, Q311V 또는 A378V로부터 선택되는 1, 2개 또는 전부의 돌연변이를 포함한다.

- [0062] 한 실시양태에서, 돌연변이는 H285, T307 또는 N315로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 H285, T307 또는 N315로부터 선택되는 2개 또는 전부의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 H285N, T307Q 또는 N315D로부터 선택되는 1, 2개 또는 전부의 돌연변이를 포함한다.
- [0063] 한 실시양태에서, 돌연변이는 H285, T307 또는 A378로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 H285, T307 또는 A378로부터 선택되는 2개 또는 전부의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 H285D, T307Q 또는 A378V로부터 선택되는 1, 2개 또는 전부의 돌연변이를 포함한다.
- [0064] 한 실시양태에서, 돌연변이는 T307, Q311 또는 A378로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T307, Q311 또는 A378로부터 선택되는 2개 또는 전부의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T307Q, Q311V 또는 A378V로부터 선택되는 1, 2개 또는 전부의 돌연변이를 포함한다.
- [0065] 한 실시양태에서, 돌연변이는 T256, N286, T307, Q311 또는 A378로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256, N286, T307, Q311 또는 A378로부터 선택되는 2, 3, 4개 또는 전부의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256D, N286D, T307R, Q311V 또는 A378V로부터 선택되는 1, 2, 3, 4개 또는 전부의 돌연변이를 포함한다.
- [0066] 한 실시양태에서, 돌연변이는 T256, H285, T307, Q311 또는 A378로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256, H285, T307, Q311 또는 A378로부터 선택되는 2, 3, 4개 또는 전부의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256D, H285D, T307R, Q311V 또는 A378V로부터 선택되는 1, 2, 3, 4개 또는 전부의 돌연변이를 포함한다.
- [0067] 한 실시양태에서, 돌연변이는 M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286 또는 K288로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286 또는 K288로부터 선택되는 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부)의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다.
- [0068] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 Fc-FcRn 결합에서 비접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0069] 한 실시양태에서, 돌연변이는 A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430 또는 A431로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430 또는 A431로부터 선택되는 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 전부)의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다.
- [0070] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 pH5.0(PDB ID: 4J12) 및 pH 6.5(PDB ID: 4Q7D)에서 결정화되는 Fc 도메인의 결정 구조의 비교에 의해 제시되는 바와 같이, 250-나선(예를 들어, P247, K248, D249, T250, L251 또는 M252 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 전부)을 포함하는 나선)의 입체형태적 역동성, 예를 들어, 250-나선에 의해 나타나는 횡방향 변위(lateral displacement) 또는 입체형태적 유연성(flexibility)을 향상시키는 나선 접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0071] 한 실시양태에서, 돌연변이는 P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306 또는 H427로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306, 또는 H427로부터 선택되는 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13개 또는 전부)의 잔기에서의 다수의 돌연변이를 포함한다.
- [0072] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 Fc-FcRn 계면을 따른 히스티딘의 도입인 돌연변이(예를 들어, Fc-FcRn 복합체에서 FcRn으로부터 7 용스트롬 미만인 Fc 영역의 표면 상의 임의의 아미노산 잔기의)를 포함한다.
- [0073] 한 실시양태에서, 돌연변이는 극성 아미노산 잔기를 도입한다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 비극성 아미노산 잔기를 도입한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 하전된 아미노산 잔기를 도입한다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 비하전 아미노산 잔기를 도입한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 양하전된(또는 염기성) 아미노산 잔기를 도입한다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 음하전된(또는 산성) 아미노산 잔기를 도입한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 소수성 아미노산 잔기를 도입한다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 친수성 아미노산 잔기를 도입한다.
- [0074] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나의(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과의) FcRn 접촉 잔기에서의

돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 T256, T307 또는 N286 중 하나 이상(예를 들어, 2개 또는 전부)에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 T256 및 T307의 돌연변이를 포함하고, 선택적으로 잔기 N286의 돌연변이를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 T256에서의 돌연변이는 극성 잔기이고, 예를 들어 T256D, T256E 또는 T256R로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 잔기 T256에서의 돌연변이는 T256D이다. 한 실시양태에서, 잔기 T307에서의 돌연변이는 극성 잔기이고, 예를 들어 T307D, T307E 또는 T307R로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 잔기 T307에서의 돌연변이는 T307R이다. 한 실시양태에서, 잔기 N286에서의 돌연변이는 N286I이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 N286I를 포함한다.

[0075] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 FcRn 접촉 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 L309, D312 또는 N315 중 하나 이상(예를 들어, 2개 또는 전부)에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 L309에서의 돌연변이를 포함하고, 선택적으로 잔기 D312 및 N315에서의 돌연변이를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 L309에서의 돌연변이는 L309N이다. 한 실시양태에서, 잔기 D312에서의 돌연변이는 D312A이다. 한 실시양태에서, 잔기 N315에서의 돌연변이는 N315D이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309N을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309N, D312A 및 N315D를 포함한다.

[0076] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 FcRn 비접촉 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 L209R, D312 또는 Q311 중 하나 이상(예를 들어, 2개 또는 전부)에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 L309 및 D312에서의 돌연변이를 포함하고, 선택적으로 잔기 Q311에서의 돌연변이를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 Q311에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 L309에서의 돌연변이는 L309R이다. 한 실시양태에서, 잔기 D312에서의 돌연변이는 D312E이다. 한 실시양태에서, 잔기 Q311에서의 돌연변이는 Q311P이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309R 및 D312E를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309R, D312E 및 Q311P를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 Q311P를 포함한다.

[0077] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 FcRn 접촉 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 I253, S254, M252 또는 R255로부터 선택되는 잔기 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3 또는 4개)의 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 I253에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 I253에서의 돌연변이는 I253M이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 S254에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 S254에서의 돌연변이는 S254H 또는 S254M이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 M252 및 S254에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 M252에서의 돌연변이는 M252E이다. 한 실시양태에서, 잔기 S254에서의 돌연변이는 S254R이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 M252, S254 및 R255에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 M252에서의 돌연변이는 M252E이다. 한 실시양태에서, 잔기 S254에서의 돌연변이는 S254R이다. 한 실시양태에서, 잔기 R255에서의 돌연변이는 R255Y이다.

[0078] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 FcRn 비접촉 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T250Q 및 M34L과 동등한 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 D376, K248, E380, M428 또는 A328로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개 또는 전부)의 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 D376에서의 돌연변이, 및 K248, E380, M428 또는 A328로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 D376에서의 돌연변이 및 잔기 K248에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 D376에서의 돌연변이 및 잔기 M428에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 D376에서의 돌연변이 및 잔기 A328에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 D376에서의 돌연변이는 D376Q 또는 D376N이다. 한 실시양태에서, 잔기 K248에서의 돌연변이는 K248S이다. 한 실시양태에서, 잔기 E380에서의 돌연변이는 E380A이다. 한 실시양태에서, 잔기 D376에서의 돌연변이는 D376Q이다. 한 실시양태에서, 잔기 M428에서의 돌연변이는 M428L이다. 한 실시양태에서, 잔기 A328에서의 돌연변이는 A328I이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 D376Q 또는 D376N 및 돌연변이 E380A를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 D376Q 및 M428L을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 D376Q 및 A328I를 포함한다.

[0079] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 FcRn 비접촉 잔기에서의

돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 K246, P247 또는 D376으로부터 선택되는 잔기 중 하나 이상(예를 들어, 2개 또는 전부)의 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 K246에서의 돌연변이 및 잔기 P247에서의 돌연변이를 포함하고, 선택적으로 잔기 D376에서의 돌연변이를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 K246에서의 돌연변이는 K246N이다. 한 실시양태에서, 잔기 P247에서의 돌연변이는 P247A이다. 한 실시양태에서, 잔기 D376에서의 돌연변이는 D376N이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 K246N 및 P247A를 포함하고, 선택적으로 돌연변이 D376N을 추가로 포함한다.

[0080] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 T256, T307, N286, A287, P257, Q311 또는 P247로부터 선택되는 잔기 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부)의 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 T256, T307, N286 및 A287에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 T256, T307 및 P257에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 T256, T307 및 P247에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 T256에서의 돌연변이는 T256D이다. 한 실시양태에서, 잔기 T307에서의 돌연변이는 T307R이다. 한 실시양태에서, 잔기 N286에서의 돌연변이는 N286I이다. 한 실시양태에서, 잔기 A287에서의 돌연변이는 A287S이다. 한 실시양태에서, 잔기 P257에서의 돌연변이는 P257L이다. 한 실시양태에서, 잔기 Q311에서의 돌연변이는 Q311V 또는 Q311L이다. 한 실시양태에서, 잔기 P247에서의 돌연변이는 P247D이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R, N286D 및 A287S를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 P257L을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 Q311V 또는 Q311L을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 P247D를 포함한다.

[0081] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 N286, A287, P247, Q311, V308, P257, N315 또는 V279로부터 선택되는 잔기 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 전부)의 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 N286, A287, P247 및 Q311에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 N286에서의 돌연변이는 N286D이다. 한 실시양태에서, 잔기 A287에서의 돌연변이는 A287S이다. 한 실시양태에서, 잔기 P247에서의 돌연변이는 P247D이다. 한 실시양태에서, 잔기 Q311에서의 돌연변이는 Q311V이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 V308 및 P257에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 V308에서의 돌연변이는 V308N이다. 한 실시양태에서, 잔기 P257에서의 돌연변이는 P257M이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 Q311, N315 및 V279에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 잔기 Q311에서의 돌연변이는 Q311L이다. 한 실시양태에서, 잔기 N315에서의 돌연변이는 N315T이다. 한 실시양태에서, 잔기 V279에서의 돌연변이는 V279I이다.

[0082] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 G433 또는 H433, P434 또는 G434, G434a, 또는 H435로부터 선택되는 잔기 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3개 또는 전부)의 잔기에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 G433, P434 및 H435에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 G433, P434, G434a 및 H435에서의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 잔기 H433, G434, P434a 및 H435에서의 돌연변이를 포함한다.

[0083] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 표 1에 기재된 바와 같은 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 돌연변이 또는 돌연변이의 하나 이상의 조합을 포함한다. 예를 들어, 돌연변이의 조합은 FcMutX라는 명칭 하에 나열된 하나 이상의 돌연변이 및 FcMutY라는 명칭 하에 나열된 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있고, 여기서 X와 Y는 표 1에 제시된 3자리 숫자이고, X는 Y와 동일하지 않다.

[0084] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 I253M을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309H, D312A 및 N315D를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309N을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 M252E 및 S254R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 M252E, S254R 및 R255Y를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 S254H를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 S254M을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256L, N286I 및 T307I를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256I, N286I 및 T307I를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 K248S 및 D376Q를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 K248S 및 D376N을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 D376Q 및 E380A를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 D376Q 및 M428L을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 K248S 및 A378I를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L314K를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 M252W를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 V308F를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 V308F 및 N434Y를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및

D376N을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309R 및 D312E를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 L309R, Q311P 및 D312E를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 K246N 및 P247A를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 K246N, P247A 및 D376N을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256E 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256R 및 T307D를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256R 및 T307E를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 Q311P를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 D376Q를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, N286D, A287S 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, P257L 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 Q311V를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 P247D, T256D 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 P257M 및 V308N을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 V279I, Q311L 및 N315T를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 H433G 및 N434P를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, N286E 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, N286Q 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, P257T 및 T307R을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 Q311I를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 Q311M을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, P257L, N286D, T307R 및 Q311V를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 돌연변이 T256D, T307R 및 M428L을 포함한다.

[0085]

한 실시양태에서, 돌연변이는 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, T256E, 또는 이들의 조합 이외의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 잔기 M252, S254, T256, L309, T250, M428, N434, N434, T307, E380, N434, M252, S254, T256, 또는 이들의 조합 이외의 잔기에서의 돌연변이이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 하기 돌연변이 또는 돌연변이들 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부)을 갖지 않는다: (i) M252Y, S254T, 및 T256E; (ii) L309N; (iii) T250Q 및 M428L; (iv) M428L 및 N434A; (v) N434A; (vi) T307A, E380A, 및 N434A; (vii) M252W; (viii) V308F; (ix) V308F 및 N434Y; 또는 (x) H435A.

[0086]

한 실시양태에서, 폴리펩티드는 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, 또는 T256E로부터 선택되는 제1 돌연변이, 및 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, 및 T256E 이외의, 표 1의 돌연변이로부터 선택되는 제2 돌연변이를 포함한다.

[0087]

한 실시양태에서, 폴리펩티드는 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, 또는 T256E로부터 선택되는 돌연변이의 조합을 포함하고, 여기서 조합은 (i) M252Y, S254T, 및 T256E; (ii) L309N; (iii) T250Q 및 M428L; (iv) M428L 및 N434A; (v) N434A; (vi) T307A, E380A, 및 N434A; (vii) M252W; (viii) V308F; (ix) V308F 및 N434Y; 또는 (x) H435A 이외의 돌연변이이다.

[0088]

한 실시양태에서, 폴리펩티드는 이펙터 기능을 증가시키는, Fc 영역에서의 돌연변이를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 예를 들어 이펙터 기능을 증가시키는, S239(예를 들어, S239D), A330(예를 들어, A330L), I332(예를 들어, I332E), F243(예를 들어, F243L), G236(예를 들어, G236A), 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다.

[0089]

한 실시양태에서, 폴리펩티드는 이펙터 기능을 감소시키는, Fc 영역에서의 돌연변이를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 예를 들어 이펙터 기능을 감소시키는, K322(예를 들어, K322A), L234(예를 들어, L234A 또는 L234F), L235(예를 들어, L235A 또는 L235E), P331(예를 들어, P331S), N297 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이이다.

[0090]

한 실시양태에서, 폴리펩티드는 Fc 영역 이외의 영역, 예를 들어 Fab 영역에서의 돌연변이를 추가로 포함한다.

[0091]

한 실시양태에서, 폴리펩티드는 다수의 돌연변이를 추가로 포함하고, 여기서 적어도 하나의 돌연변이는 보상성 돌연변이, 예를 들어, 본원에서 설명되는 보상성 돌연변이이다.

[0092]

한 실시양태에서, 폴리펩티드는 단리된 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 합성 폴리펩티드이다.

[0093]

한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폴리펩티드를 포함하는 조성물, 예를 들어, 약학 조성물을 특징

으로 한다. 한 실시양태에서, 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.

[0094] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 특징으로 한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 특징으로 한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 핵산 분자 또는 본원에서 설명되는 벡터를 포함하는 세포, 예를 들어, 단리된 세포를 특징으로 한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폴리펩티드 및 폴리펩티드의 사용 설명서를 포함하는 키트를 특징으로 한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폴리펩티드를 포함하는 용기를 특징으로 한다.

[0095] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폴리펩티드를 생산하는 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 항체 분자의 생산을 허용하는 조건 하에 본원에서 설명되는 세포를 배양하여 폴리펩티드를 생산하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 폴리펩티드를 단리 또는 정제하는 것을 추가로 포함한다.

[0096] 한 측면에서, 본 개시내용은 장애(예를 들어, 본원에서 설명되는 장애)를 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 장애 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에서 설명되는 폴리펩티드 또는 본원에서 설명되는 조성물의 유효량을 투여하여 장애를 치료하는 것을 포함한다.

[0097] 한 측면에서, 본 개시내용은 장애(예를 들어, 본원에서 설명되는 장애)의 치료 방법에 사용하기 위한, 본원에서 설명되는 폴리펩티드를 특징으로 한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 장애(예를 들어, 본원에서 설명되는 장애)의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 본원에서 설명되는 폴리펩티드의 용도를 특징으로 한다.

[0098] 한 측면에서, 본 개시내용은 분자를 검출하는 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 대상체로부터의 세포 또는 샘플을 본원에서 설명되는 폴리펩티드와 접촉시킴으로써 분자를 검출하는 단계를 포함한다.

[0099] 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 상기 측면 및/또는 실시양태의 모든 조합뿐만 아니라, 상세한 설명 및 실시 예에 제시된 임의의 하나 이상의 실시양태와의 조합을 고려한다.

[0100] 본원의 조성물 및 방법의 다른 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 도면 및 청구 범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 FcRn과 IgG1 사이의 결합을 도시한 것이다.

도 2는 Fc 영역의 다양한 결합 부위를 도시한 것이다.

도 3은 FcRn의 pH 특이적 결합(engagement)을 위한 구조적 기초를 도시한 것이다.

도 4는 Fc-FcRn 상호작용 계면의 매핑을 도시한 것이다. CH2 및 CH3 도메인은 상이한 회색 음영으로 표시되고 제시된다.

도 5는 Fc-FcRn 결합의 네트워크 도면을 도시한 것이다.

도 6은 항-CH1 고정 항체에 대한 FcRn 결합 및 pH 특이적 결합 향상을 도시한 것이다.

도 7은 세포 기반 FcRn 결합 경쟁 검정의 결과를 도시한 것이다.

도 8은 Fc γ RI 및 Fc γ RIIIa에 대한 예시적인 항체 분자의 결합을 도시한 것이다.

도 9는 예시적인 항체 분자의 열 안정성을 도시한 것이다.

도 10은 Tg32 마우스에서의 예시적인 항체 분자의 반감기를 도시한 것이다.

도 11a는 예시적인 Fc 조작된 항체의 K_d , k_{on} 및 k_{off} 를 도시한 것이다. 같은 WT Fc를 함유한 IgG와 비교한 변화 배수로서 나타내었다.

도 11b는 대표적인 Fc 조작된 항체의 pH 6.0에서의 FcRn에 대한 개선된 결합 및 pH 7.4에서의 FcRn에 대한 불량한 결합을 도시한 것이다.

도 11c는 항체 Fc의 CH2 도메인과 FcRn 분자의 상호작용을 도시한 것이다.

도 12는 Fc 조작된 변이체의 생물물리학적 특성을 도시한 것이다.

도 13a는 WT 모타비주맙(Mota-WT)에 비해 개선된 3개의 모타비주맙 Fc 변이체의 생체내 반감기를 도시한 것이다.

도 13b는 2개의 모타비주맙 Fc 변이체 및 WT 모타비주맙의 약동학적 특성을 도시한 것이다.

도 14a는 5 mg/kg의 투여량으로 투여된 WT 모타비주맙(Mota-WT)에 비해 개선된 후기 단계의 모타비주맙 Fc 변이체의 생체내 반감기를 도시한 것이다.

도 14b는 5 mg/kg의 투여량으로 투여된 후기 단계의 모타비주맙 Fc 변이체 및 WT 모타비주맙의 약동학적 특성을 도시한 것이다.

도 14c는 2 mg/kg의 투여량으로 투여된 WT 모타비주맙(Mota-WT)에 비해 개선된 후기 단계의 모타비주맙 Fc 변이체의 생체내 반감기를 도시한 것이다.

도 14d는 2 mg/kg의 투여량으로 투여된 후기 단계의 모타비주맙 Fc 변이체 및 WT 모타비주맙의 약동학적 특성을 도시한 것이다.

도 15는 ZVB 지카(Zika) 항체의 보다 긴 생체내 반감기를 도시한 것이다.

도 16은 ZKB-LS(LS Fc 돌연변이를 갖는 ZVB 항체) 및 ZKB-156(비스테라(Visterra) 156 Fc 돌연변이를 갖는 ZVB 항체)의 유사한 반감기를 도시한 것이다. 이들 항체는 모두 모 ZVB 항체(ZKB) 및 WT 모타비주맙보다 긴 반감기를 가졌다.

도 17a는 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA 및 C1q에 대한 예시적인 Fc 변이체의 결합을 도시한 것이다.

도 17b는 Fc γ RIIIA에 대한 FcMut213의 결합을 야생형과 비교하여 도시한 것이다.

도 17c는 Fc γ RIIA에 대한 FcMut213의 결합을 야생형과 비교하여 도시한 것이다.

도 17d는 C1q에 대한 FcMut213의 결합을 야생형과 비교하여 도시한 것이다.

도 18은 예시적인 Fc 변이체(리툭시맙 Fab)의 CDC 활성을 도시한 것이다. 계산은 4-파라미터 피트(four-parameter fit)의 중간점이 아니라, 50% 용해를 달성하는 농도를 기초로 한다.

도 19a-19b는 예시적인 Fc 변이체(리툭시맙 Fab)의 ADCC 활성을 도시한 것이다.

도 20a는 IgG Fc 구조 및 Fc-FcRn 상호작용을 도시한 것이다.

도 20b는 2개의 상이한 pH에서의 Fc의 구조를 도시한 것이다.

도 21a는 Fc-FcRn 상호작용을 매개하는 잠재력을 갖는 잔기의 유형을 도시한 것이다.

도 21b는 예시적인 조작된 Fc 변이체의 주요 잔기의 분자 상호작용을 도시한 것이다.

도 22는 예시적인 옥텟 센소그램(Octet sensogram)을 도시한 것이다.

도 23은 예시적인 Fc 변이체의 SEC 프로파일 및 T_m을 도시한 것이다.

도 24는 Fc γ RIIIA(ADCC 활성) 및 C1q(CDC 활성)에 대한 Fc 변이체의 결합을 도시한 것이다.

도 25a는 Fc 변이체를 갖는 IgG의 약동학적 특성을 도시한 것이다. 플롯은 시간 경과에 따른 IgG의 농도 변화를 보여준다.

도 25b는 예시적인 Fc 변이체의 PK 특성화를 도시한 것이다.

도 26은 Fc 변이체를 갖는 모타비주맙 Fab의 TRIM21에 대한 결합을 도시한 것이다.

도 27a는 FcRn-Fc 복합체, 단백질 A-Fc 복합체, Trim21-Fc 복합체, 및 Fc-Fc 육량체 복합체의 구조를 도시한 것이다.

도 27b는 Fc 도메인 역학을 강조하는 Fc 도메인의 결정 구조의 중첩을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본원에서 표적 분자 또는 세포, 예를 들어 인간 단백질 또는 세포에 높은 친화도 및 특이성으로 결합하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)이 개시된다. 유리하게는, 여러 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분

자 또는 융합 단백질)는 순환 반감기와 같은 하나 이상의 개선된 또는 바람직한 약동학적 특성을 갖는다. 특정 이론에 매이는 것을 원하지 않지만, 폴리펩티드는 인간에서 다양한 순환 반감기를 가질 수 있으며, 순환 반감기는 예를 들어 혈청 및 세포 성분과의 상호작용, 유체상 음세포 작용(pinocytosis)의 속도, FcRn과의 상호작용, 수용체 매개 세포내 이입(endocytosis), 약물 투여, 및 항-약물 항체의 생성에 영향을 줄 수 있다고 생각된다. 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 코딩하는 핵산 분자, 밸런 벡터, 숙주 세포, 조성물(예를 들어, 약학 조성물), 키트, 용기 및 폴리펩티드(예를 들어 항체 분자 또는 융합 단백질)의 생산 방법이 또한 제공된다. 본원에서 개시되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질) 및 약학 조성물은 장애 및 병태, 예를 들어 표적 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포와 관련된 장애 및 병태, 예를 들어 본원에서 설명되는 장애 및 병태를 치료, 예방 및/또는 진단하기 위해 (단독으로 또는 다른 작용제 또는 치료 양상과 조합하여) 사용될 수 있다.

[0103] 특정 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, 일부 실시양태에서, IgG의 긴 순환 반감기는 신생아 Fc 수용체(FcRn)와 회합함으로써 그의 엔도솜 분해를 최소화하는 그의 능력에 기인한다고 생각된다. FcRn은 모체로부터 태아로의 IgG 분자의 태반 이동에서 및 혈청 IgG 항상성에서 중요한 역할을 한다(Leach *et al.*, *J Immunol*, 1996. 157(8): 3317-22; Simister *et al.*, *Eur J Immunol*, 1996. 26(7): 1527-31; Kristoffersen, *APMIS Suppl*, 1996. 64: 5-36; Roopenian *et al.*, *J Immunol*, 2003. 170(7): 3528-33; Junghans and Anderson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(11): 5512-6). 초기 엔도솜의 산성 환경은 IgG 및 알부민이 FcRn에 결합하여 IgG를 분해로부터 보호하고 IgG를 세포외 환경으로 되돌려보내는 것을 도울 수 있고, 상기 세포외 환경에서 생리학적 pH에 노출되면 분자는 순환계로 다시 방출된다. 이 경로는 주로 IgG와 알부민 둘 모두의 연장된 혈청 반감기에 기여할 수 있다(Junghans and Anderson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(11): 5512-6; Chaudhury *et al.*, *J Exp Med*, 2003. 197(3): 315-22).

[0104] 항체의 Fc 도메인은 주로 항체 재순환을 용이하게 하기 위해 FcRn에 대한 결합을 책임진다. 일부 실시양태에서, 동일한 Fc 영역을 갖는 항체가 상이한 순환 반감기를 가질 수 있는데, 그 이유는 열 안정성, 혈청 및 세포 성분과의 상호작용, 항-약물 항체의 존재, 고 투여량, 수용체 매개 세포내 이입, 및 유체상 음세포 작용과 같은 많은 요인이 항체 분해를 촉진하고 그의 반감기에 부정적인 영향을 미칠 수 있기 때문이다. IgG와 FcRn의 상호작용은 엔도솜 분해로부터 항체를 보호하고 항체의 반감기를 연장시키는 역할을 할 수 있다. Fc의 변형은 FcRn 상호작용을 촉진하고 따라서 항체의 반감기를 연장하기 위해 사용될 수 있다(Ghetie *et al.*, *Nat Biotechnol*, 1997. 15(7): p. 637-40; Dall'Acqua *et al.*, *J Biol Chem*, 2006. 281(33): 23514-24; Hinton *et al.*, *J Biol Chem*, 2004. 279(8): 6213-6; Vaccaro *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2005. 23(10): 1283-8; Zalevsky *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2010. 28(2): 157-9; Dall'Acqua *et al.*, *J Immunol*, 2002. 169(9): 5171-80; Monnet *et al.*, *MAbs*, 2014. 6(2): 422-36; Monnet *et al.*, *Front Immunol*, 2015. 6: 39; Shields *et al.*, *J Biol Chem*, 2001. 276(9): 6591-604; Robbie *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57(12): 6147-53).

[0105] IgG의 Fc는 또한 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII, C1q 및 TRIM21과 같은 다양한 다른 수용체에 결합할 수 있으며, 이를 상호작용은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP), 및 항체 의존성 세포내 중화(ADIN)와 같은 다양한 이펙터 기능을 매개한다. Fc 변이체를 확인하기 위해 사용되는 전통적인 접근법은 주로 무작위 돌연변이 유발 및 디스플레이 형식에 의존하고, 항체의 특정 중요 특성, 예를 들어 이펙터 기능 또는 생물물리적 안정성을 손상시킨다.

[0106] 특정 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 바와 같은 FcRn 결합 또는 반감기 연장을 위한 Fc의 조작은 Fc에 의해 매개되는 다양한 이펙터 기능의 측면에서 수행된다고 생각된다. 예를 들어, 중성 및 산성 pH에서 Fc와 FcRn의 상호작용을 조사하기 위해 구조적 및 네트워크 기반 프레임워크를 사용할 수 있다. 이 프레임워크를 사용하여, FcRn 결합을 개선하기 위한, 예를 들어 상호작용의 k_{off} 를 감소시키기 위한 상이한 경로를 확인할 수 있다. 돌연변이의 상호작용 네트워크가 평가될 수 있고, 돌연변이가 조합되어 FcRn 및 다른 Fc 수용체에 대한 결합에 대해 평가될 수 있다. 예를 들어, 반감기를 증가시키고, ADCC 및 CDC와 같은 이펙터 기능을 보유하고 일부 경우에는 향상시키는 Fc 변이체를 확인할 수 있다. 상이한 질환의 예방 및 치료를 위한 치료제로서 항체 및 융합 단백질의 사용이 증가함에 따라, 예를 들어, 만성 질환을 치료 또는 예방하기 위해, 긴 반감기를 갖는 항체 및 융합 단백질을 개발할 필요성이 커지고 있다.

0107] 정의

[0108] 본원에서 사용되는 바와 같이, 관사 "a" 및 "an"은 관사의 문법적 대상을 중 하나 또는 하나 초과(예를 들어, 적어도 하나)를 지칭한다.

- [0109] 용어 "또는"은 문맥상 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 용어 "및/또는"을 의미하기 위해 본원에서 사용되고, "및/또는"과 교환 가능하게 사용된다.
- [0110] "약" 및 "대략"은 일반적으로 측정의 특성 또는 정밀도를 고려하여 측정된 양에 대한 허용 가능한 오차의 정도를 의미한다. 예시적인 오차의 정도는 주어진 값 또는 값의 범위의 20% 이내, 일반적으로 10% 이내, 보다 일반적으로 5% 이내이다.
- [0111] 본원에서 개시되는 조성을 및 방법은 특정 서열, 또는 이에 대해 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예를 들어, 특정 서열에 적어도 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 동일한 서열을 갖는 폴리펩티드 및 핵산을 포함한다.
- [0112] 아미노산 서열의 맥락에서, 용어 "실질적으로 동일한"은 제1 및 제2 아미노산 서열이 공통적인 구조적 도메인 및/또는 공통적인 기능적 활성을 가질 수 있도록, 제1 아미노산이 제2 아미노산 서열 내의 정렬된 아미노산 잔기에 대해 i) 동일한 또는 ii) 보존적 치환인 아미노산 잔기를 충분한 또는 최소한의 수로 포함함을 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 아미노산 서열은 참조 서열, 예를 들어, 본원에서 제공된 서열과 적어도 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 공통적인 구조적 도메인을 포함한다.
- [0113] 뉴클레오티드 서열의 맥락에서, 용어 "실질적으로 동일한"은 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열이 공통적인 기능적 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하거나 또는 공통적인 구조적 폴리펩티드 도메인 또는 공통적인 기능적 폴리펩티드 활성을 코딩하도록 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열 내의 정렬된 뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드를 충분한 또는 최소한의 수로 포함함을 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열은 참조 서열, 예를 들어, 본원에서 제공된 서열과 적어도 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는다.
- [0114] 용어 "기능적 변이체"는 자연 발생 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖거나 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되고 자연 발생 서열의 하나 이상의 활성을 가질 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0115] 서열 사이의 상동성 또는 서열 동일성(이들 용어는 본원에서 교환 가능하게 사용됨)의 계산은 다음과 같이 수행된다.
- [0116] 2개의 아미노산 서열, 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 비율을 결정하기 위해서, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 어느 하나 또는 둘 모두에 캡이 도입될 수 있으며, 비교 목적을 위해 비-상동성 서열은 무시될 수 있다). 일반적인 실시양태에서, 비교 목적을 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열 길이의 적어도 30%, 예를 들어, 적어도 40%, 50%, 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 80%, 90%, 100%이다. 이어서, 대응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열의 한 위치에 제2 서열의 대응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 존재하면, 이들 분자는 그 위치에서 동일한 것이다.
- [0117] 두 서열 사이의 동일성 비율은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 캡의 수 및 각각의 캡의 길이를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 합수이다.
- [0118] 두 서열 사이의 서열 비교 및 동일성 비율의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 두 아미노산 서열 사이의 동일성 비율은 블로썸(Blossum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 캡 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 이용하는, GCG 소프트웨어 패키지(www.gcg.com에서 이용 가능)의 GAP 프로그램에 통합된, 문헌 [Needleman and Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453]의 알고리즘을 이용하여 결정된다. 특정 실시양태에서, 두 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 비율은 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 80의 캡 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 이용하는 GCG 소프트웨어 패키지(www.gcg.com에서 이용 가능)의 GAP 프로그램을 이용하여 결정된다. 적합한 한 세트의 파라미터(및 달리 명시되지 않는다면 사용되어야 하는 세트)는 캡 폐널티(gap penalty) 12, 캡 연장 폐널티(gap extend penalty) 4, 및 프레임시프트(frameshift) 캡 폐널티 5를 이용하는 블로썸 62 스코어링 매트릭스이다.
- [0119] 두 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 비율은 PAM120 가중치 잔기 표, 캡 길이 폐널티 12 및 캡 폐널티 4를 사용하는 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합된, 문헌 [E. Meyers and W. Miller, (1989) CABIOS, 4:11-17]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0120] 본원에서 설명되는 핵산 및 단백질 서열은 예를 들어 다른 패밀리 구성원 또는 관련 서열을 확인하기 위해 공개

데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "조회(query) 서열"로서 사용될 수 있다. 이러한 검색은 문헌 [Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 이용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 본원에서 설명되는 핵산과 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 워드 길이 = 12로 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본원에서 설명되는 단백질 분자에 대해 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 워드 길이 = 3으로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위해 갭 도입된(gapped) 정렬을 얻기 위해, Gapped BLAST를 문헌 [Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다. www.ncbi.nlm.nih.gov를 참조한다.

[0121]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "낮은 염격도, 중간 염격도, 높은 염격도, 또는 매우 높은 염격도 조건 하에서 혼성화하다"는 혼성화 및 세척을 위한 조건을 설명한다. 혼성화 반응을 수행하기 위한 지침은 참고로 포함된 문헌 [*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 볼 수 있다. 수성 및 비수성 방법이 상기 문헌에 기재되어 있으며, 어떤 방법이든 이용할 수 있다. 본원에서 언급되는 구체적인 혼성화 조건은 다음과 같다: 1) 낮은 염격도 혼성화 조건: 6X 염화나트륨/시트르산나트륨(SSC) 내에서 약 45°C, 이어서 0.2X SSC, 0.1% SDS 내에서 적어도 50°C에서 2회 세척(세척 온도는 낮은 염격도 조건을 위해 55°C로 승온될 수 있다); 2) 중간 염격도 혼성화 조건: 6X SSC 내에서 약 45°C, 이어서 0.2X SSC, 0.1% SDS 내에서 60°C에서 1회 이상의 세척; 3) 높은 염격도 혼성화 조건: 6X SSC 내에서 약 45°C, 이어서 0.2X SSC, 0.1% SDS 내에서 65°C에서 1회 이상의 세척; 및 바람직하게는 4) 매우 높은 염격도 혼성화 조건: 0.5 M 인산나트륨, 7% SDS, 65°C, 이어서 0.2X SSC, 1% SDS 내에서 65°C에서 1회 이상의 세척. 매우 높은 염격도 조건 4)가 적합한 조건이고, 달리 명시되지 않으면 사용되어야 하는 조건이다.

[0122]

본원에서 설명되는 분자는 그 기능에 실질적인 영향을 미치지 않는 추가의 보존적 또는 비필수적인 아미노산 치환을 가질 수 있는 것으로 이해된다.

[0123]

용어 "아미노산"은 아미노 관능기 및 산 관능기 둘 모두를 포함하고 자연 발생 아미노산의 중합체에 포함될 수 있는 천연 또는 합성된 모든 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 예시적인 아미노산은 자연 발생 아미노산; 그의 유사체, 유도체 및 동질체(congener); 변이체 측쇄를 갖는 아미노산 유사체; 및 상기한 임의의 것의 모든 입체 이성질체를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산"은 D- 또는 L-광학 이성질체 및 펩티드 모방체(peptidomimetic)를 모두 포함한다.

[0124]

"보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 관련 기술 분야에 정의되어 있다. 이러한 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다.

[0125]

용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"(단일쇄인 경우)은 임의의 길이의 아미노산 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 교환 가능하게 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비아미노산에 의해 차단될 수 있다. 상기 용어는 또한 변형된, 예를 들어, 디솔피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작, 예컨대 표지 성분과의 접합을 갖는 아미노산 중합체를 포함한다. 폴리펩티드는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나, 진핵 또는 원핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생산될 수 있거나, 합성 절차의 산물일 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 분자이다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 융합 단백질이다.

[0126]

용어 "핵산", "핵산 서열", "뉴클레오티드 서열" 또는 "폴리뉴클레오티드 서열" 및 "폴리뉴클레오티드"는 교환 가능하게 사용된다. 이들은 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오티드로서, 테옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 그의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥이거나 이중 가닥일 수 있으며, 단일 가닥일 경우 코딩 가닥 또는 비코딩(안티센스) 가닥일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비뉴클레오티드 성분에 의해 차단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예를 들어 표지 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 핵산은 재조합 폴리뉴클레오티드, 또는 자연에서 발생하지 않거나 또 다른 폴리뉴클레오티드에 비자연적인 배열로 연결된 게놈, cDNA, 반합성, 합성 기원의 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

- [0127] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 그의 본래의 또는 천연 환경(예를 들어, 자연 발생하는 경우 자연 환경)으로부터 제거된 물질을 나타낸다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 자연 발생의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이 아니지만, 자연계에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 인간의 개입에 의해 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나, 이러한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 조성물의 일부일 수 있으며, 상기 벡터 또는 조성물은 자연에서 발견되는 환경의 일부분이 아니라는 점에서 역시 단리된 것일 수 있다.
- [0128] 본원에서 사용되는 바와 같이, 예를 들어, 본원에서 설명되는 장애를 "치료하다"라는 용어는 장애, 예를 들어 본원에서 설명되는 장애를 갖고/갖거나 장애, 예를 들어 본원에서 설명되는 장애의 증상을 경험하는 대상체(예를 들어, 인간)가 한 실시양태에서 항체 분자가 투여되지 않은 경우보다 항체 분자가 투여될 때 덜 심각한 증상을 보이고/보이거나 더 빨리 회복할 것임을 의미한다. 치료는 장애의 영향 또는 증상, 특징 및/또는 원인의 하나 이상의 징후의 심각성을 부분적으로 또는 완전히 완화, 개선, 경감, 억제 또는 감소시키고/시키거나 발병률을 감소시키고 선택적으로 발생을 지연할 수 있다. 한 실시양태에서, 치료는 장애의 특정 징후를 나타내지 않는 대상체 및/또는 장애의 초기 징후만을 나타내는 대상체에 대한 것이다. 한 실시양태에서, 치료는 장애의 하나 이상의 확립된 징후를 나타내는 대상체에 대한 것이다. 한 실시양태에서, 치료는 장애를 앓고 있는 것으로 진단된 대상체에 대한 것이다.
- [0129] 본원에서 사용되는 바와 같이, 장애를 "예방하다"라는 용어는 대상체(예를 들어, 인간)에게 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)를 투여하면 장애가 생길 가능성이 더 적어짐을 의미한다.
- [0130] 본원의 조성물 및 방법의 다양한 측면이 아래에서 보다 상세하게 설명된다. 추가의 정의는 명세서 전체에 걸쳐 제시된다.
- [0131] **항체 분자**
- [0132] 항체 분자, 예를 들어 Fc 영역, 예를 들어 본원에서 설명되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 포함하는 및/또는 본원에서 설명되는 하나 이상의 구조적 또는 기능적 특성을 갖는 항체 분자가 본원에서 개시된다.
- [0133] 한 실시양태에서, 항체 분자는 Fc 영역을 함유하는 항체 분자(예를 들어, 모 항체 분자)로부터 조작되거나 유도된다. 예를 들어, 조작된 항체 분자 또는 항체 분자 유도체는 모 항체 분자와 상이한 Fc 영역을 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 Fc 영역을 함유하지 않는 항체 분자(예를 들어, 모 항체 분자)로부터 조작되거나 유도된다. 예를 들어, 조작된 항체 분자 또는 항체 분자 유도체는 모 항체 분자 또는 그의 기능적 단편에 직접 또는 간접적으로 융합된 Fc 영역을 가질 수 있다.
- [0134] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체 분자"는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 단백질, 예를 들어 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편을 의미한다. 용어 "항체 분자"는 예를 들어 전장, 성숙 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 예를 들어, 항체 분자는 중쇄(H) 가변 도메인 서열(본원에서 VH로 약칭함) 및 경쇄(L) 가변 도메인 서열(본원에서 VL로 약칭함)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체 분자는 2개의 중쇄(H) 가변 도메인 서열 및 2개의 경쇄(L) 가변 도메인 서열을 포함하여 2개의 항원 결합 부위를 형성하고, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, Fc, Fd, Fd', Fv, 단일쇄 항체(예를 들어, scFv), 단일 가변 도메인 항체, 디아바디(Dab)(2가 및 이중특이적), 및 전체 항체의 변형에 의해 생성될 수 있는 키메라(예를 들어, 인간화된) 항체, 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 새롭게 합성된 항체를 포함한다. 이들 기능적 항체 단편은 그 각각의 항원 또는 수용체에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 항체 및 항체 단편은 IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE를 포함하고 이로 제한되지 않는 항체의 임의의 클래스로부터, 및 항체의 임의의 하위클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)로부터 유래될 수 있다. 항체 분자는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 항체 분자는 또한 인간, 인간화, CDR 이식(grafted) 또는 시험관내 생성 항체일 수 있다. 항체 분자는 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터 선택된 중쇄 불변 영역을 가질 수 있다. 항체 분자는 또한 카파 또는 람다로부터 선택된 경쇄를 가질 수 있다. 용어 "면역글로불린"(Ig)은 본원에서 용어 "항체"와 교환 가능하게 사용된다.
- [0135] 항원 결합 단편의 예는 다음을 포함한다: (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 디슬퍼드 다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진 디아바디(dAb) 단편; (vi) 낙타류(camelid) 또는 낙타화(camelized) 가변 도메인; (vii) 단일쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 문헌 [Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426]; 및 [Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883] 참조); (viii) 단일 도메인 항체. 이들 항체 단편은 관련

기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 여러 통상적인 기술을 사용하여 얻을 수 있고, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0136] 용어 "항체"는 온전한 분자 및 그의 기능적 단편을 포함한다. 항체의 불변 영역은 항체의 특성을 변경하기 위해 (예를 들어, Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스테인 잔기의 수, 이펙터 세포 기능 또는 보체 기능 중 하나 이상을 증가시키거나 감소시키기 위해) 변경, 예를 들어 돌연변이될 수 있다.

[0137] 항체 분자는 단일쇄 항체일 수 있다. 단일쇄 항체(scFv)는 조작될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Colcher, D. et al. (1999) *Ann N Y Acad Sci* 880:263-80]; 및 [Reiter, Y. (1996) *Clin Cancer Res* 2:245-52] 참조). 단일쇄 항체는 동일한 표적 단백질의 상이한 애피토프에 대한 특이성을 갖는 다가 항체를 생성하기 위해 이량체화되거나 다량체화될 수 있다.

[0138] 본원에서 개시되는 항체 분자는 또한 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 그의 상보성 결정 영역이 단일 도메인 폴리펩티드의 일부인 항체를 포함할 수 있다. 그 예는 중쇄 항체, 경쇄가 본래 결여된 항체, 통상적인 4개 사슬의 항체로부터 유래된 단일 도메인 항체, 조작된 항체 및 항체로부터 유래된 것 이외의 단일 도메인 스캐폴드를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 단일 도메인 항체는 관련 기술 분야의 임의의 항체 또는 임의의 장래의 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 야마, 어류, 상어, 염소, 토끼 및 소를 포함하고 이로 제한되지 않는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 몇몇 측면에 따르면, 단일 도메인 항체는 경쇄가 결여된 중쇄 항체로서 알려진 자연 발생 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체는 예를 들어 WO 94/04678에 개시되어 있다. 명확성을 위해, 본래 경쇄가 결여된 중쇄 항체로부터 유래된 상기 가변 도메인은 이를 4개 사슬의 면역글로불린의 통상적인 VH와 구별하기 위해 본원에서 VHH 또는 나노바디 (nanobody)로서 언급된다. 이러한 VHH 분자는 카멜리대(Camelidae) 종에서, 예를 들어 낙타, 야마, 단봉낙타, 알파카 및 과나코에서 생성된 항체로부터 유래될 수 있다. 카멜리대 이외의 종은 본래 경쇄가 결여된 중쇄 항체를 생산할 수 있고, 그러한 VHH도 또한 고려된다.

[0139] VH 및 VL 영역은 "프레임워크 영역"(FR 또는 FW)으로 명명된 보다 보존된 영역이 그 사이에 산재된 "상보성 결정 영역"(CDR)으로 지칭되는 초가변성 영역으로 세분될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "상보성 결정 영역" 및 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산의 서열을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "프레임워크", "FW" 및 "FR"은 교환 가능하게 사용된다.

[0140] 프레임워크 영역 및 CDR의 정도는 많은 방법으로 정확하게 정의되어 왔다(문헌 [Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917]; 및 옥스포드 몰레큘라의 AbM 항체 모델링 소프트웨어(Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)에서 사용되는 AbM 정의 참조). 전반적으로, 예를 들어, 문헌 [Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed: Duebel, S and Kontermann, R, Springer-Verlag, Heidelberg)]을 참조한다. 한 실시양태에서, 다음 정의가 사용된다: 중쇄 가변 도메인의 CDR1의 AbM 정의 및 다른 CDR에 대한 카바트(Kabat) 정의. 한 실시양태에서, 카바트 정의가 모든 CDR에 대해 사용된다. 또한, 카바트 또는 AbM CDR과 관련하여 설명된 실시양태가 코티아(Chothia) 초가변 루프를 사용하여 실행될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4의 순서로 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다.

[0141] 본원에서 사용되는 바와 같이, "면역글로불린 가변 도메인 서열"은 면역글로불린 가변 도메인의 구조를 형성할 수 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 서열은 자연 발생 가변 도메인의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열은 1, 2개 또는 그 초과의 N- 또는 C 말단 아미노산을 포함하거나 포함하지 않을 수 있거나, 또는 단백질 구조의 형성과 양립할 수 있는 다른 변경을 포함할 수도 있다.

[0142] 용어 "항원 결합 영역"은 항원, 또는 그의 애피토프에 결합하는 계면을 형성하는 결정자를 포함하는 항체 분자의 부분을 의미한다. 단백질(또는 단백질 모방체)에 관하여, 항원 결합 영역은 전형적으로 항원에 결합하는 계면을 형성하는 하나 이상의 루프(예를 들어 적어도 4개의 아미노산 또는 아미노산 모방체의)를 포함한다. 전형적으로, 항체 분자의 항원 결합 영역은 적어도 1 또는 2개의 CDR 및/또는 초가변 루프, 또는 보다 전형적으로는 적어도 3, 4, 5 또는 6개의 CDR 및/또는 초가변 루프를 포함한다.

[0143] 용어 "경쟁하다" 또는 "교차 경쟁하다"는 또 다른 항체 분자의 표적에 대한 결합을 방해하는 항체 분자의 능력을 지칭하기 위해 본원에서 교환 가능하게 사용된다. 결합 방해는 직접 또는 간접적일 수 있다(예를 들어, 항체

분자 또는 표적의 알로스테릭(allosteric) 조절을 통해). 항체 분자가 또 다른 항체 분자의 표적에 대한 결합을 방해할 수 있는 정도, 및 그에 따라서 경쟁한다고 언급될 수 있는지의 여부는 경쟁 결합 검정, 예를 들어 FACS 검정, ELISA 또는 BIACORE 검정을 사용하여 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 경쟁 결합 검정은 정량적 경쟁 검정이다. 한 실시양태에서, 제1 항체 분자는 제1 항체 분자의 표적에 대한 결합이 경쟁 결합 검정(예를 들어, 본원에서 설명되는 경쟁 검정)에서 10% 이상, 예를 들어 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 감소될 때 표적에 대한 결합을 위해 제2 항체 분자와 경쟁한다고 언급된다.

[0144] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 보인다. 모노클로날 항체는 하이브리도마 기술 또는 하이브리도마 기술을 사용하지 않는 방법(예를 들어, 재조합 방법)에 의해 제조할 수 있다.

[0145] "효과적인 인간" 단백질은 중화 항체 반응, 예를 들어, 인간 항-뮤린 항체(HAMA) 반응을 일으키지 않는 단백질이다. HAMA는 여러 상황에서, 예를 들어, 항체 분자가 예를 들어, 만성 또는 재발성 질환 상태의 치료시에 반복적으로 투여되는 경우에 문제가 될 수 있다. HAMA 반응은 혈청으로부터의 항체 제거가 증가하기 때문에(예를 들어, 문헌 [Saleh et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 32:180-190 (1990)] 참조) 및 또한 잠재적인 알레르기 반응 때문에(예를 들어, 문헌 [LoBuglio et al., *Hybridoma*, 5:5117-5123 (1986)] 참조), 반복적인 항체 투여를 잠재적으로 비효과적으로 만들 수 있다.

[0146] 항체 분자는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 재조합 방식으로, 예를 들어 임의의 적합한 파지 디스플레이 또는 조합 방법에 의해 생산될 수 있다.

[0147] 항체 생성을 위한 다양한 파지 디스플레이 및 조합 방법이 관련 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호; Kang 등의 국제 공개 WO 92/18619; Dower 등의 국제 공개 WO 91/17271; Winter 등의 국제 공개 WO 92/20791; Markland 등의 국제 공개 WO 92/15679; Breitling 등의 국제 공개 WO 93/01288; McCafferty 등의 국제 공개 WO 92/01047; Garrard 등의 국제 공개 WO 92/09690; Ladner 등의 국제 공개 WO 90/02809; [Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; 및 Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982] 참조).

[0148] 한 실시양태에서, 항체 분자는 완전 인간 항체(예를 들어, 인간 면역글로불린 서열로부터 항체를 생산하도록 유전적으로 조작된 마우스에서 생성된 항체), 또는 비인간 항체, 예를 들어 설치류(마우스 또는 래트), 염소, 영장류(예를 들어, 원숭이), 낙타 항체이다. 한 실시양태에서, 비인간 항체는 설치류(마우스 또는 래트 항체)이다. 설치류 항체를 생산하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0149] 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템이 아닌 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉(transgenic) 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 관심 있는 항원으로 면역화된 이들 트랜스제닉 마우스로부터의 비장 세포를 사용하여 인간 단백질로부터의 에피토프에 대한 특이적 친화성을 갖는 인간 mAb를 분비하는 하이브리도마를 제조한다(예를 들어, Wood 등의 국제 공개 WO 91/00906, Kucherlapati 등의 PCT 공개 WO 91/10741; Lonberg 등의 국제 공개 WO 92/03918, Kay 등의 국제 공개 92/03917, Lonberget al. 1994 *Nature* 368:856-859; Green, L.L. et al. 1994 *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S.L. et al. 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 *Year Immunol* 7:33-40; Tuailion et al. 1993 *PNAS* 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 *Eur J Immunol* 21:1323-1326 참조).

[0150] 항체는 가변 영역 또는 그의 일부, 예를 들어 CDR이 비인간 유기체, 예를 들어 래트 또는 마우스에서 생성된 것일 수 있다. 키메라, CDR 이식된 및 인간화된 항체가 본 발명에 포함된다. 인간에서 항원성을 감소시키기 위해 비인간 유기체, 예를 들어 래트 또는 마우스에서 생성된 후, 예를 들어 가변 프레임워크 또는 불변 영역에서 변형된 항체가 본 발명에 포함된다.

[0151] 키메라 항체는 임의의 적합한 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 몇몇은 관련 기술 분야에 공지되어 있다 (Robinson 등의 국제 특허 출원 PCT/US86/02269; Akira 등의 유럽 특허 출원 184,187; Taniguchi, M.의 유럽 특허 출원 171,496; Morrison 등의 유럽 특허 출원 173,494; Neuberger 등의 국제 공개 WO 86/01533; Cabilly

등의 미국 특허 제4,816,567호; Cabilly 등의 유럽 특허 출원 125,023; [Better et al. (1988) *Science* 240:1041-1043]; Liu et al. (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; 및 Shaw et al., 1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80:1553-1559] 참조).

[0152] 인간화 또는 CDR 이식된 항체는 적어도 1 또는 2개, 일반적으로는 3개의 모든 수여자 CDR(면역글로불린 중쇄 및 /또는 경쇄의)이 공여자 CDR로 대체될 것이다. 항체는 비인간 CDR의 적어도 일부로 대체될 수 있거나 또는 일부의 CDR만이 비인간 CDR로 대체될 수 있다. 단지 리포폴리사카라이드에 대한 인간화된 항체의 결합에 필요한 CDR의 수를 대체할 필요가 있다. 한 실시양태에서, 공여자는 설치류 항체, 예를 들어, 래트 또는 마우스 항체일 것이며, 수여자는 인간 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크일 것이다. 전형적으로, CDR을 제공하는 면역글로불린은 "공여자"로 불리고, 프레임워크를 제공하는 면역글로불린은 "수용자"로 불린다. 일부 실시양태에서, 공여자 면역글로불린은 비인간 동물(예를 들어, 설치류)이다. 수용자 프레임워크는 전형적으로 자연 발생(예를 들어, 인간) 프레임워크 또는 컨센서스 프레임워크, 또는 그에 대해 약 85% 이상, 예를 들어, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일한 서열이다.

[0153] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "컨센서스 서열"은 관련 서열 패밀리에서 가장 빈번하게 발생하는 아미노산(또는 뉴클레오티드)으로 형성된 서열을 지칭한다(예를 들어, 문헌 [Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987] 참조)). 단백질 패밀리에서, 컨센서스 서열의 각각의 위치는 패밀리 내의 그 위치에서 가장 빈번하게 발생하는 아미노산에 의해 점유된다. 2개의 아미노산이 동등한 정도로 빈번하게 발생한다면, 어느 것이든 컨센서스 서열에 포함될 수 있다. "컨센서스 프레임워크"는 컨센서스 면역글로불린 서열의 프레임워크 영역을 지칭한다.

[0154] 항체는 임의의 적합한 방법 및 관련 기술 분야에 공지된 여러 방법에 의해 인간화될 수 있다(예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 문헌 [Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207, Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214], 및 Queen 등의 US 5,585,089, US 5,693,761 및 US 5,693,762 참조).

[0155] 인간화 또는 CDR 이식된 항체는 CDR 이식 또는 CDR 치환에 의해 생성될 수 있고, 여기서 면역글로불린 사슬의 1, 2개 또는 모든 CDR이 대체될 수 있다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함된 미국 특허 제5,225,539호; [Jones et al. 1986 *Nature* 321:552-525; Verhoeven et al. 1988 *Science* 239:1534; Beidler et al. 1988 *J. Immunol.* 141:4053-4060]; Winter US 5,225,539를 참고한다. 윈터(Winter)는 인간화 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있는 CDR 이식 방법을 설명하고 있고(1987년 3월 26일 출원된 영국 특허 출원 GB 2188638A; Winter US 5,225,539), 그 내용은 본원에 명백하게 참고로 포함된다.

[0156] 또한, 특정 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 인간화 항체가 제공된다. 공여자로부터 아미노산을 선택하기 위한 기준은 예를 들어 US 5,585,089, 예를 들어, US 5,585,089의 컬럼 12-16에 기재되어 있으며, 그 내용은 본원에 참고로 포함된다. 항체를 인간화하는 다른 기술은 1992년 12월 23일 공개된 EP 519596 A1(Padlan 등)에 기재되어 있다.

[0157] 한 실시양태에서, 항체 분자는 예를 들어 IgG1, IgG2(예를 들어, IgG2a), IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE의 중쇄 불변 영역으로부터 선택됨; 특히 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 (예를 들어, 인간) 중쇄 불변 영역으로부터 선택된 중쇄 불변 영역을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 예를 들어 카파 또는 람다의 (예를 들어, 인간) 경쇄 불변 영역으로부터 선택된 경쇄 불변 영역을 갖는다. 불변 영역은 항체 분자의 특성을 변경하기 위해(예를 들어, Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스테인 잔기의 수, 이펙터 세포 기능 및 /또는 보체 기능 중 하나 이상을 증가시키거나 감소시키기 위해) 변경, 예를 들어 돌연변이될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 이펙터 기능을 갖고, 보체를 고정할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 이펙터 세포를 동원하거나 보체를 고정하지 않는다. 특정 실시양태에서, 항체 분자는 Fc 수용체에 결합하는 능력이 감소되거나 또는 상기 능력을 전혀 갖지 않는다. 예를 들어, 이것은 Fc 수용체에 대한 결합을 지지하지 않는 이소형 또는 아형, 단편 또는 다른 돌연변이체일 수 있고, 예를 들어 돌연변이되거나 결실된 Fc 수용체 결합 영역을 갖는다.

[0158] 한 실시양태에서, 항체 분자의 불변 영역이 변경된다. 항체 불변 영역을 변경하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 변경된 기능, 예를 들어 이펙터 리간드, 예컨대 세포 상의 FcR 또는 보체의 C1 성분에 대한 변경된 친화도를 갖는 항체 분자는 항체의 불변 부분 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 잔기로 대체함으로써 생산될 수 있다(예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 EP 388,151 A1, 미국 특허 제5,624,821호 및 미국 특허 제5,648,260호 참조). 인간 IgG4에서 S228P(EU 명명법, 카바트 명명법의 S241P)와 같은 항체

구조를 안정화하는 아미노산 돌연변이가 또한 고려된다. 뮤린 또는 다른 종의 면역글로불린에 적용될 경우 상기 기능을 감소시키거나 제거하는 유사한 유형의 변경이 설명될 수 있다.

[0159] 한 실시양태에서, 항체 분자 내의 유일한 아미노산은 표준(canonical) 아미노산이다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 자연 발생 아미노산; 그의 유사체, 유도체 및 동질체; 변형된 측쇄를 갖는 아미노산 유사체; 및/또는 상기 한 임의의 것의 모든 입체이성질체를 포함한다. 항체 분자는 아미노산 및 웨티드모방체의 D- 또는 L-광학 이성질체를 포함할 수 있다.

[0160] 본원에서 설명되는 항체 분자의 폴리펩티드는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비아미노산에 의해 차단될 수 있다. 항체 분자는 또한 예를 들어 디슬피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해 변형될 수 있다. 폴리펩티드는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나, 진핵 또는 원핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생산될 수 있거나, 합성 절차의 산물일 수 있다.

[0161] 본원에서 설명되는 항체 분자는 비접합 형태로 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 물질, 예를 들어 독소 또는 모이어티(예를 들어, 치료 약물, 방사선 방출 화합물; 식물, 진균 또는 박테리아 기원의 분자; 또는 생물학적 단백질(예를 들어, 단백질 독소) 또는 입자(예를 들어, 재조합 바이러스 입자, 예를 들어 바이러스 코트 단백질)에 결합될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자는 방사성 동위원소, 예컨대 α - , β - , 또는 γ -방출체(emitter), 또는 β - 및 γ -방출체에 결합될 수 있다.

[0162] 항체 분자는 유도체화되거나 또는 다른 기능 분자(예를 들어, 다른 웨티드 또는 단백질)에 연결될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "유도체화된" 항체 분자는 변형된 것이다. 유도체화 방법은 형광 모이어티, 방사성 뉴클레오티드, 독소, 효소 또는 친화성 리간드, 예컨대 비오틴의 부가를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 따라서, 항체 분자는 면역 부착 분자를 비롯하여 본원에서 설명되는 유도체화된 형태 및 달리 변형된 형태의 항체를 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 항체 분자는 항체 또는 항체 일부와 또 다른 분자(예컨대, 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)의 결합을 매개 할 수 있는 하나 이상의 다른 엔티티(entity), 예컨대 또 다른 항체(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 디아바디), 검출 가능 작용제, 독소, 약학 제제 및/또는 단백질 또는 웨티드에 기능적으로 연결될 수 있다(화학적 커플링, 유전자 융합, 비공유 회합 등에 의해).

[0163] 유도체화된 항체 분자의 일부 유형은 2개 이상의 항체(동일한 유형 또는 예를 들어 이중특이적 항체를 생성하기 위한 상이한 유형의)를 가교결합시킴으로써 생성된다. 적합한 가교결합제는 적합한 스페이서(예를 들어, m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르)에 의해 분리되는 2개의 구별되는 반응기를 가진 이중2기능성(heterobifunctional), 또는 동종2기능성(homobifunctional)(예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트)인 것을 포함한다. 상기 링커는 피어스 케미컬 컴퍼니(Pierce Chemical Company, 미국 일리노이주 록포드 소재)로부터 구입 가능하다.

[0164] 항-뗑기 항체 분자가 유도체화(표지)될 수 있는 유용한 검출 가능 작용제는 형광 화합물, 다양한 효소, 보결 분자단, 발광 물질, 생물발광 물질, 형광 방출 금속 원자, 예를 들어 유로퓸(Eu), 및 기타 안타니드, 및 방사성 물질(아래에서 설명됨)을 포함한다. 예시적인 형광 검출 가능 작용제는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5디메틸아민-1-나프탈렌술포닐 클로라이드, 피코에리트린 등을 포함한다. 또한, 항체는 검출 가능한 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제, 양고추냉이 페옥시다제, β -갈락토시다제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코스 옥시다제 등으로 유도체화될 수 있다. 항체가 검출 가능한 효소로 유도체화될 때, 항체는 효소가 검출 가능한 반응 산물을 생산하기 위해 사용하는 추가의 시약을 첨가하여 검출된다. 예를 들어, 검출 가능한 작용제로서 양고추냉이 페옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘을 첨가하여 검출 가능한 발색된 반응 산물을 생성할 수 있다. 또한, 항체 분자는 보결 분자단(예를 들어, 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴)으로 유도체화될 수 있다. 예를 들어, 항체는 비오틴으로 유도체화되고, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합을 간접적으로 측정함으로써 검출될 수 있다. 적합한 형광 물질의 예는 웜벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고, 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고, 생물발광 물질의 예는 루시페라제, 루시페린, 및 에퀴린을 포함한다.

[0165] 표지된 항체 분자는 예를 들어 (i) 친화도 크로마토그래피 또는 면역 침전과 같은 표준 기술에 의한 미리 결정된 항원의 단리; (ii) 단백질 발현의 빈도 및 패턴을 평가하기 위한 미리 결정된 항원(예를 들어, 세포 용해물 또는 세포 상청액 내의)의 검출; (iii) 예를 들어, 주어진 치료 요법의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 절차의 일부로서의 조직 내의 단백질 수준의 모니터링을 포함하는 많은 상황에서 진단 목적으로 및/또는 실험적으로 사

용될 수 있다.

[0166] 항체 분자는 또 다른 분자 엔티티, 전형적으로 표지 또는 치료(예를 들어, 항미생물(예를 들어, 항박테리아 또는 살박테리아), 면역조절, 면역자극, 세포독성, 또는 세포 증식 억제) 작용제 또는 모이어티에 접합될 수 있다. 방사성 동위원소는 진단 또는 치료 용도에 사용될 수 있다. 항체 분자에 커플링될 수 있는 방사성 동위원소는 α - , β - , 또는 γ -방출체, 또는 β - 및 γ -방출체를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 상기 방사성 동위원소는 요오드(^{131}I 또는 ^{125}I), 이트륨(^{90}Y), 루테튬(^{177}Lu), 악티늄(^{225}Ac), 프라세오디뮴, 아스타틴(^{211}At), 레늄(^{186}Re), 비스무트(^{212}Bi 또는 ^{213}Bi), 인듐(^{111}In), 테크네튬(^{99}mTc), 인(^{32}P), 로듐(^{188}Rh), 황(^{35}S), 탄소(^{14}C), 트리튬(^3H), 크롬(^{51}Cr), 염소(^{36}Cl), 코발트(^{57}Co 또는 ^{58}Co), 철(^{59}Fe), 셀레늄(^{75}Se), 또는 갈륨(^{67}Ga)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 치료제로서 유용한 방사성 동위원소는 이트륨(^{90}Y), 루테튬(^{177}Lu), 악티늄(^{225}Ac), 프라세오디뮴, 아스타틴(^{211}At), 레늄(^{186}Re), 비스무트(^{212}Bi 또는 ^{213}Bi), 및 로듐(^{188}Rh)을 포함한다. 예를 들어, 진단에 사용하기 위한, 표지로서 유용한 방사성 동위원소는 요오드(^{131}I 또는 ^{125}I), 인듐(^{111}In), 테크네튬(^{99}mTc), 인(^{32}P), 탄소(^{14}C), 및 트리튬(^3H), 또는 상기에 열거된 하나 이상의 치료 동위원소를 포함한다.

[0167] 본 개시내용은 방사성 표지된 항체 분자 및 그의 표지 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 분자의 표지 방법이 개시된다. 이 방법은 항체 분자를 킬레이팅제와 접촉시켜 접합된 항체를 생성하는 단계를 포함한다. 접합된 항체는 방사성 동위원소, 예를 들어, $^{111}\text{인듐}$, $^{90}\text{이트륨}$ 및 $^{177}\text{루테튬}$ 으로 방사성 표지되어 표지된 항체 분자를 생성한다.

[0168] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 개시되는 항체 분자를 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 항원, 또는 그의 단편을 제공하는 단계; 항원에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 수득하는 단계; 항원 및/또는 항원을 발현하는 유기체의 활성을 조절하는 항체 분자의 효능을 평가하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 또한 그의 유도체(예를 들어, 인간화된 항체 분자)를 포함하는 항체 분자를 대상체, 예를 들어 인간에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0169] 본 개시내용은 상기 항체 분자를 코딩하는 단리된 핵산 분자, 백터 및 그의 숙주 세포를 제공한다. 핵산 분자는 RNA, 게놈 DNA 및 cDNA를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

융합 단백질

[0171] 융합 단백질, 예를 들어 Fc 영역, 예를 들어, 본원에서 설명되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 포함하고/하거나, 본원에서 설명되는 하나 이상의 구조적 또는 기능적 특성을 갖는 융합 단백질이 본원에서 개시된다.

[0172] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 Fc 영역을 함유하는 폴리펩티드(예를 들어, 모 폴리펩티드)(예를 들어, 융합 단백질)로부터 조작되거나 유도된다. 예를 들어, 조작된 폴리펩티드 또는 유도체는 모 폴리펩티드와 상이한 Fc 영역을 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 Fc 영역을 함유하지 않는 폴리펩티드(예를 들어, 모 폴리펩티드)로부터 조작되거나 유도된다. 예를 들어, 조작된 항체 분자 또는 항체 분자 유도체는 모 폴리펩티드에 직접 또는 간접적으로 융합된 Fc 영역을 가질 수 있다.

[0173] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "융합 단백질"은 2개 이상의 단백질 또는 펩티드 성분을 포함하는 단백질을 지칭한다. 둘 이상의 단백질 또는 펩티드 성분은 상이한 공급원으로부터 수득되거나 상이한 유전자에 의해 코딩될 수 있다. 융합 단백질은 때로는 키메라 단백질로도 언급된다. Fc-융합 단백질(Fc 키메라 융합 단백질, Fc-Ig, Ig-기반 키메라 융합 단백질 또는 Fc-태그 단백질로도 알려짐)은 단백질 또는 펩티드에 연결된(예를 들어, 융합된) 면역글로불린의 Fc 영역(예를 들어, 본원에서 설명되는 Fc 영역)을 포함할 수 있다. Fc 영역은 단백질 또는 펩티드에 직접 또는 간접적으로, 예를 들어 링커를 통해 연결(예를 들어, 유전적으로 융합)될 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 IgG, 예를 들어 인간 IgG, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc 영역으로부터 유도된다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1, 예를 들어 인간 IgG1의 Fc 영역으로부터 유도된다.

[0174] Fc-융합 결합 파트너는 다양한 단백질 또는 펩티드, 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 영역은 펩티드(예를 들어, 치료용 펩티드), 리간드(예를 들어, 세포 표면 수용체와 결합할 때 활성화하는 리간드), 신호전달 분자, 수용체의 세포외 도메인 또는 미끼(bait) 단백질(예를 들어, 단백질 마이크로어레이와 같이 결합 파트너를 확인하기 위해 사용되는)에 융합될 수 있다.

- [0175] 한 실시양태에서, Fc 융합 단백질은 수용체 또는 가용성 수용체의 세포외 도메인 또는 그의 리간드 결합 부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 수용체는 성장 인자 수용체이다. 한 실시양태에서, 수용체는 사이토카인 수용체이다. 한 실시양태에서, 수용체는 면역 검사점 분자이다.
- [0176] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합된, 인간 VEGF 수용체 1 및 2의 세포외 도메인으로부터의 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 아플리베르셉트이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질(예를 들어, 아플리베르셉트)은 본원에서 설명되는 장애, 예를 들어, 눈 장애(예를 들어, 습식 황반 변성) 또는 암(예를 들어, 결직장암)을 치료하기 위해 사용된다.
- [0177] 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합된 가용성 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 2를 포함한다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 에타네르셉트이다. 한 실시양태에서, Fc 융합 단백질(예를 들어, 에타네르셉트)은 본원에서 설명되는 장애, 예를 들어, 자가면역 장애(예를 들어, 류마티스성 관절염)를 치료하기 위해 사용된다.
- [0178] 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합된 인간 인터류킨-1 수용체 1(IL-1R1) 및 IL-1 수용체 부속(accessory) 단백질(IL-1RAcP)의 세포외 부분의 리간드 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 릴로나셉트이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질(예를 들어, 릴로나셉트)은 본원에서 설명되는 장애, 예를 들어, 크리오파린 관련 주기적 증후군(CAPS: cryopyrin-associated periodic syndrome), 예를 들어 가족성 한랭 자가염증성 증후군, 머클-웰즈(Muckle-Wells) 증후군 또는 신생아기 다발성 염증성 질환을 치료하기 위해 사용된다.
- [0179] 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합된 CTLA-4의 세포외 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질(예를 들어, 아바타셉트 또는 벨라타셉트)은 본원에서 설명되는 장애, 예를 들어 장기 거부, 자가면역 장애(예를 들어, 류마티스성 관절염) 또는 암을 치료하기 위해 사용된다.
- [0180] 한 실시양태에서, Fc 융합 단백질은 웨티드, 예를 들어 치료용 웨티드를 포함한다.
- [0181] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합된 트롬보포이에틴-결합 웨티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 로미플로스팀이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질(예를 들어, 로미플로스팀)은 본원에서 설명되는 장애, 예를 들어 만성 특발성(면역성) 혈소판 감소성 자반병(ITP)을 치료하기 위해 사용된다.
- [0182] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합된 인간 백혈구 기능 항원-3(LFA-3)의 세포외 CD2 결합 부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 알레파셉트이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질(예를 들어, 알레파셉트)은 본원에서 설명되는 장애, 예를 들어 자가면역 장애(예를 들어, 건선) 또는 암(예를 들어, 피부 T-세포 림프종 또는 T-세포 비-호지킨(Hodgkin) 림프종)을 치료하기 위해 사용된다.
- [0183] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 응고 인자를 포함한다.
- [0184] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 IgG1의 Fc 영역과 융합된 인자 IX를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 IgG1의 Fc 영역과 융합된 인자 VIII를 포함한다. 한 실시양태에서, 융합 단백질(예를 들어, FIX-Fc 융합체 또는 FVIII-Fc 융합체)은 본원에서 설명되는 장애, 예를 들어, 혈우병 A 또는 혈우병 B를 치료하기 위해 사용된다.
- [0185] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함하거나, 또는 글리코실화된다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 글리코실화 부위를 갖지 않거나, 또는 글리코실화되지 않는다.
- [0186] 한 실시양태에서, 융합 단백질 내의 아미노산은 표준 아미노산이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 자연 발생 아미노산; 그의 유사체, 유도체 및 동질체; 변형된 측쇄를 갖는 아미노산 유사체; 및/또는 상기한 임의의 것의 모든 임체이성질체를 포함한다. 융합 단백질은 아미노산 및 웨티드모방체의 D- 또는 L-광학 이성질체를 포함할 수 있다.
- [0187] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 개시되는 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 본원에서 설명되는 융합 단백질은 임의의 적합한 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 융합 단백질의 생산을 허용하는 조건 하에서 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 함유하는 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 융합 단백질을 단리 또는 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 세포 기반 검정 또는 동물 모델에서 상기 융합 단백질의 효능을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 대상체, 예를 들어 인간에게 융합 단백질을 투여하는 단계

를 추가로 포함한다.

[0188] 본 개시내용은 상기 융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 벡터 및 그의 숙주 세포를 제공한다. 핵산 분자는 RNA, 게놈 DNA 및 cDNA를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0189] Fc 영역

[0190] 단편 결정화 가능 영역, 즉 Fc 영역은 Fc 수용체와 상호작용할 수 있는 면역글로불린의 영역을 지칭한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 또한 보체계의 단백질과 상호작용할 수 있다. 이론에 매이는 것을 원하지 않지만, 한 실시양태에서 Fc 영역과 Fc 수용체 사이의 상호작용은 면역계의 활성화를 가능하게 한다고 생각된다.

[0191] IgG, IgA 및 IgD 항체 이소형에서, 자연 발생 Fc 영역은 일반적으로 항체의 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 도메인으로부터 유도된 2개의 동일한 단백질 단편을 포함한다. 자연 발생 IgM 및 IgE Fc 영역은 일반적으로 각각의 폴리펩티드 사슬에 3개의 중쇄 불변 도메인(C_H 도메인 2-4)을 포함한다. IgG의 Fc 영역은 고도로 보존된 N-글리코실화 부위를 함유할 수 있다(Stadlmann et al. (2008). *Proteomics* 8 (14): 2858-2871; Stadlmann (2009) *Proteomics* 9 (17): 4143-4153). 이론에 매이는 것을 원하지 않지만, 한 실시양태에서, Fc 단편의 글리코실화는 Fc 수용체 매개 활성에 기여하는 것으로 생각된다(Peipp et al. (2008) *Blood* 112 (6): 2390-2399). 한 실시양태에서, 이 부위에 부착된 N-글리칸은 주로 복합형의 코어-푸코실화된 2중 촉각(diantennary) 구조이다. 또 다른 실시양태에서, 소량의 이들 N-글리칸은 또한 이등분하는 GlcNAc 및/또는 α-2,6 연결된 시알산 잔기를 함유한다.

[0192] 예시적인 Fc 영역 아미노산 서열을 아래에 제시한다.

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPALQSSGL
YSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK ( 서열 번호 1)
```

[0193]

[0194] 서열 번호 1에서, 이 서열에서의 제1 아미노산 잔기는 본원에서 위치 118로 언급된다. 굵게 표시되고 밑줄이 그어진 3개의 히스티딘은 각각 위치 310, 433 및 435이다.

[0195]

본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 표 1에 제시된 하나 이상의(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 초과의)의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 가질 수 있다.

[0196]

<표 1> 예시적인 Fc 돌연변이

명칭	돌연변이
FcMut001	I253M
FcMut002	L309H_D312A_N315D
FcMut003	L309N
FcMut004	M252E_S254R
FcMut005	M252E_S254R_R255Y
FcMut006	S254H
FcMut007	S254M
FcMut008	T256D_T307R
FcMut009	T256L_N286I_T307I
FcMut010	T256I_N286I_T307I
FcMut011	K248S_D376Q
FcMut012	K248S_D376N
FcMut013	D376Q_E380A
FcMut014	D376N_E380A
FcMut015	D376Q_M428L
FcMut016	K248S_A378I
FcMut017	L314K
FcMut018	T250Q_M428L
FcMut019	M428L_N434A
FcMut020	N434A
FcMut021	T307A_E380A_N434A
FcMut022	M252W
FcMut023	V308F
FcMut024	V308F_N434Y
FcMut026	T256D_T307R_D376N
FcMut027	L309R_D312E
FcMut028	L309R_Q311P_D312E
FcMut029	K246N_P247A
FcMut030	K246N_P247A_D376N
FcMut031	T256E_T307R
FcMut032	T256R_T307D
FcMut033	T256R_T307E
FcMut034	Q311P
FcMut035	D376Q
FcMut036	L234A_L235A
FcMut037	L235V_G236A
FcMut038	L234P_L235P
FcMut039	L235P
FcMut040	P329G
FcMut041	P329E
FcMut042	E233K

[0197]

FcMut043	T256D_N286D_A287S_T307R
FcMut044	T256D_P257L_T307R
FcMut045	T256D_T307R_Q311V
FcMut046	P247D_T256D_T307R
FcMut047	P247D_N286D_A287S_Q311V
FcMut048	P257M_V308N
FcMut049	V279I_Q311L_N315T
FcMut050	M428L_N434S
FcMut051	N434S
FcMut052	H433G_N434P
FcMut053	V259I_V308F_M428L
FcMut067	T256D_N286D_T307R
FcMut068	T256D_N286E_T307R
FcMut069	T256D_N286Q_T307R
FcMut070	T256D_P257T_T307R
FcMut071	T256D_P257V_T307R
FcMut072	T256D_T307R_Q311I
FcMut073	T256D_T307R_Q311L
FcMut074	T256D_T307R_Q311M
FcMut075	T256D_P257L_N286D_T307R_Q311V
FcMut076	T256D_T307R_M428L
FcMut077	M428L
FcMut078	M252Y_S254T_T256Q
FcMut079	M252Y_S254T_T256E_K288E
FcMut080	T256K_K288E
FcMut081	T256D_E258T
FcMut082	E283Q_H285E
FcMut083	R344D_D401R
FcMut084	K248E_E380K
FcMut085	K248E_E380R
FcMut086	K246H
FcMut087	K248H
FcMut088	T250I
FcMut089	T250V
FcMut090	L251F
FcMut091	L251M
FcMut093	P257V
FcMut094	N276D
FcMut095	H285N
FcMut096	H285D
FcMut097	K288H
FcMut098	K288Q
FcMut099	K288E
FcMut100	T307E
FcMut101	T307Q
FcMut102	V308P
FcMut103	V308I
FcMut104	V308L
FcMut105	L309H
FcMut106	L309M
FcMut107	Q311H
FcMut108	L314F
FcMut109	Y319H

[0198]

FcMut110	I336T
FcMut111	P343D
FcMut112	P343V
FcMut113	E345Q
FcMut114	P346V
FcMut115	P374T
FcMut116	D376N
FcMut117	A378S
FcMut118	A431T
FcMut119	A431P
FcMut120	A431G
FcMut121	L432V
FcMut122	L432I
FcMut123	L432Q
FcMut124	N434T
FcMut125	H435N
FcMut126	Y436H
FcMut127	K439Q
FcMut128	T256D
FcMut129	T307R
FcMut130	A378T
FcMut131	A378D
FcMut132	A378H
FcMut133	A378Y
FcMut134	A378V
FcMut135	D376R
FcMut136	D376F
FcMut137	D376W
FcMut138	L314H
FcMut139	L432E_T437Q
FcMut140	D376Q_A378T
FcMut141	D376Q_I377M_A378T
FcMut142	P244Q_D376Q
FcMut143	P247T_A378T
FcMut144	P247N_A378T
FcMut145	T256D_T307R_L309T
FcMut146	A339T_S375E_F404Y
FcMut147	L235V_G236A_T256D_T307R
FcMut148	L235V_G236A_D376Q_M428L
FcMut149	L314N
FcMut150	N315D
FcMut151	A378T
FcMut152	T437Q
FcMut153	L432E
FcMut154	Y436R
FcMut155	L314M
FcMut156	L234A_L235A_T256D_T307R_Q311V
FcMut157	L234A_L235A_T256D_P257V_T307R
FcMut158	L234A_L235A_T256D_P257L_N286D_T307R_Q311V
FcMut159	L235V_G236A_T256D_T307R_Q311V
FcMut160	L235V_G236A_T256D_P257V_T307R
FcMut161	L235V_G236A_T256D_P257L_N286D_T307R_Q311V
FcMut162	S267T_A327N_A330M

[0199]

FcMut163	S267T_A327N
FcMut164	L235V_G236A_S267T_A327N_A330M
FcMut165	L235V_G236A_S267T_A327N
FcMut166	M252Y_S254T
FcMut167	T256E
FcMut168	G236A_I332E
FcMut169	S239D_I332E
FcMut170	G236A_S239D_I332E
FcMut171	T256D_N286D_T307R_Q311V
FcMut172	T256D_E258T_T307R
FcMut173	T256D_E258T_T307R_Q311V
FcMut174	T256D_P257V_E258T_T307R
FcMut175	T256D_P257L_E258T_N286D_T307R_Q311V
FcMut176	T256D_E258T_N286D_T307R_Q311V
FcMut177	A378V_M428L
FcMut178	A378V_M428I
FcMut179	A378V_M428V
FcMut180	T256D_N286D
FcMut181	T256D_A378V
FcMut182	T256D_Q311V
FcMut183	T256D_Q311V_A378V
FcMut184	T256D_T307R_A378V
FcMut185	T256D_N286D_T307R_A378V
FcMut186	T256D_T307R_Q311V_A378V
FcMut187	H285D_A378V
FcMut188	H285D_Q311V
FcMut189	T256D_H285D
FcMut190	T256D_H285D_Q311V
FcMut191	T256D_H285D_T307R
FcMut192	T256D_H285D_T307R_A378V
FcMut193	H285D_L314M_A378V
FcMut194	T256D_E258T_H285D_Q311H
FcMut195	T256D_E258T_H285D
FcMut196	H285D_N315D
FcMut197	H285N_T307Q_N315D
FcMut198	H285D_L432E_T437Q
FcMut199	T256D_E258T_N315D
FcMut200	P257V_H285N
FcMut201	H285N_L432F
FcMut202	H285N_T437I
FcMut203	T256D_E258T_L314M
FcMut204	T256D_E258T_T307Q
FcMut205	T256D_E258T_A378V
FcMut206	V308P_A378V
FcMut207	P257V_A378T
FcMut208	P257V_V308P_A378V
FcMut209	N315D_A378T
FcMut210	H285N_L314M
FcMut211	L314M_L432E_T437Q
FcMut212	T307Q_N315D
FcMut213	H285D_T307Q_A378V
FcMut214	L314M_N315D
FcMut215	T307Q_Q311V_A378V

[0200]

FcMut216	H285D_Q311V_A378V
FcMut217	Q311V_N315D_A378V
FcMut218	T256D_E258T_Q311V
FcMut219	T256D_N315D_A378V
FcMut220	T256D_Q311V_N315D
FcMut221	T256D_T307Q_A378V
FcMut222	T256D_T307Q_Q311V
FcMut223	T256D_H285D_A378V
FcMut224	T256D_H285D_T307R_Q311V
FcMut225	T256D_H285D_N286D_T307R
FcMut226	T256D_H285D_N286D_T307R_Q311V
FcMut227	T256D_H285D_N286D_T307R_A378V
FcMut228	T256D_N286D_T307R_Q311V_A378V
FcMut229	T256D_H285D_T307R_Q311V_A378V
FcMut230	V308P_Q311V_A378V
FcMut231	T256D_V308P_A378V
FcMut232	T256D_V308P_Q311V
FcMut233	T256D_E258T_V308P
FcMut234	H285D_V308P_Q311V
FcMut242	E258T
FcMut243	N286D
FcMut244	Q311V
YTE	M252Y_S254T_T256E

[0201]

실시양태에서, Fc 영역은 FcMut202를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut203을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut204를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut205를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut206을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut207을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut208을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut209를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut210을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut211을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut212를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut213을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut214를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut215를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut216을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut217을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut218을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut219를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut220을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut221을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut222를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut223을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut224를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut225를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut226을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut227을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut228을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut229를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut230을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut231을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut232를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut233을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut234를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut242를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut243을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut244를 포함한다.

[0203] 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut045, FcMut171, FcMut183, FcMut186, FcMut190, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut216, FcMut219, FcMut222, FcMut223, FcMut224, FcMut226, FcMut227, FcMut228, 또는 FcMut229로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 그 초과)의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut045, FcMut183, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228, 또는 FcMut156으로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부)의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut183, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228, 또는 FcMut229로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 전부)의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함한다.

[0204] 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut018, FcMut021, FcMut050, FcMut102, 또는 YTE로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개 또는 전부)의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 FcMut018, FcMut021, FcMut050, FcMut102, 또는 YTE로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개 또는 전부)의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 및 표 1에 제시된 하나 이상의 다른 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함한다.

[0205] 한 실시양태에서, Fc 영역은 본원에서 설명되는 바와 같은 상승작용 효과(예를 들어, 결합 친화도 또는 순환 반감기)를 유도하는, 표 1에 제시된 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20개 또는 그 초과)의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함한다.

[0206] 한 실시양태에서, Fc 영역은 T256, H285, N286, T307, Q311, N315, 또는 A378로부터 선택되는 잔기에서의 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 T256D, H285N, N286D, T307Q, Q311V, N315D, 또는 A378V로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개)의 돌연변이를 포함한다.

[0207] 한 실시양태에서, Fc 영역은 반감기 연장 돌연변이, Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 둘 모두를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 예를 들어 M252W, V308F/N434Y, R255Y, P257L/N434Y, V308F, P257N/M252Y, G385N, P257N/V308Y, N434Y, M252Y/S254T/T256E ("YTE"), M428L/N434S ("LS"), 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함한다. 대안으로, 또는 추가로, 한 실시양태에서, Fc 영역은 (a) T256D/Q311V/A378V, H285N/T307Q/N315D, H285D/T307Q/A378V, T307Q/Q311V/A378V, T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V, 또는 T256D/T307R/Q311V로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 전부)의 돌연변이의 조합; (b) Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 예를 들어 L234A/L235A("LALA" 돌연변이로도 알려짐), 또는 (c) (a)와 (b) 둘 모두를 포함한다.

[0208] 한 실시양태에서, Fc 영역은 돌연변이 T256D/Q311V/A378V 및 Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 예를 들어 L234A/L235A를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 돌연변이 H285N/T307Q/N315D 및 Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 예를 들어 L234A/L235A를 포함한다. 한

실시양태에서, Fc 영역은 돌연변이 H285D/T307Q/A378V 및 Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 예를 들어 L234A/L235A를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 돌연변이 T307Q/Q311V/A378V 및 Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 예를 들어 L234A/L235A를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 돌연변이 T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V 및 Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 예를 들어 L234A/L235A를 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 돌연변이 T256D/T307R/Q311V 및 Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 예를 들어 L234A/L235A를 포함한다.

[0209] 참조 Fc 영역 아미노산 서열(본원에서 사용되는 넘버링 포함)은 아래에서 제공된다(예를 들어, 본원에서 설명되는 돌연변이 위치의 확인을 위해). CH2 도메인 서열은 밑줄로 표시되고; 힌지 영역 서열은 이탈릭체로, CH3 도메인 서열은 굵은 글씨체로 표시된다.

```

118 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAL
175 QSSGLYSLSVVTVPPSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPA
232 PELLGGPSVFLFPPKPDKTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
287 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
344 REPQVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWEESNGOPENNYKTPPVLDs
401 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ( 서열 번호 1)

```

[0210] 본원에서 설명되는 임의의 반감기 연장 돌연변이는 Fc 이펙터 기능을 증강하거나 방해할 수 있는 임의의 Fc 돌연변이와 조합하여 사용될 수 있다.

[0211] Fc 영역은 다양한 세포 수용체(예를 들어, Fc 수용체) 및 보체 단백질에 결합할 수 있다. Fc 영역은 또한 항체 분자의 상이한 생리학적 효과, 예를 들어, 옵소닌화된 입자의 겹출; 세포 용해; 비만 세포, 호염기구 및 호산구의 탈과립화; 및 기타 과정을 매개할 수 있다.

[0212] 그들이 인식하는 항체의 유형에 따라 분류할 수 있는 Fc 수용체(FcR)의 몇 가지 상이한 유형이 존재한다.

[0213] Fc γ 수용체(Fc γ R)는 면역글로불린 수퍼페밀리에 속하며, 예를 들어 옵소닌화된 미생물의 식세포 작용 유도에 관여한다. 이 패밀리에는 그의 상이한 문자 구조로 인해 그의 항체 친화도가 상이한 여러 구성원, 즉 Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIA(CD32), Fc γ RIIB(CD32), Fc γ RIIIA(CD16a), Fc γ RIIB(CD16b) 등이 포함된다. 예를 들어, Fc γ RI은 Fc γ RII 또는 Fc γ RIII보다 더 강하게 IgG에 결합할 수 있다. Fc γ RI은 또한 Fc γ RII 또는 Fc γ RIII보다 도메인이 하나 더 많은, 3개의 면역글로불린(Ig) 유사 도메인을 포함하는 세포외 부분을 갖는다. 이 특성은 Fc γ RI이 오직 하나의 IgG 분자(또는 단량체)에 결합하는 것을 허용하지만, Fc γ 수용체는 일반적으로 활성화될 면역 복합체 내의 다수의 IgG 분자에 결합할 필요가 있다.

[0214] Fc γ 수용체는 IgG에 대한 친화도가 상이하고, 상이한 IgG 서브클래스는 각각의 Fc γ 수용체에 대해 특유한 친화도를 가질 수 있다. 이러한 상호작용은 IgG의 특정 위치에서 글리칸(올리고사카라이드)에 의해 추가로 조정될 수 있다. 예를 들어, 입체 장애를 생성함으로써, CH2-84.4 글리칸을 함유하는 푸코스는 Fc γ RIIIA에 대한 IgG 친화도를 감소시키는 반면, 갈락토스가 결여되고 그 대신에 GlcNAc 모이어티로 종결되는 G0 글리칸은 Fc γ RIIIA에 대해 증가된 친화도를 갖는다(Maverakis et al. (2015) *Journal of Autoimmunity* 57 (6): 1-13).

[0215] 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 여러 세포 유형에서 발현되고, MHC 클래스 I과 구조가 유사하다. 이 수용체는 또한 IgG에 결합하고, 이 항체의 보존에 관여한다(Zhu et al. (2001), *Journal of Immunology* 166 (5): 3266-76). FcRn은 또한 IgG를 엄마로부터 태반을 통해 태아에게 또는 젖을 먹고 있는 유아에게 모유를 통해 전달하는데도 관여한다. 이 수용체는 또한 IgG 혈청 수준의 항상성에 기여할 수 있다.

[0216] Fc αRI(또는 CD89)은 Fc αR 하위군에 속한다. Fc αRI은 호중구, 호산구, 단핵구, 대식세포(куп퍼(Kupffer) 세포 포함) 및 수지상 세포의 표면에서 발견된다. 이것은 2개의 세포외 Ig 유사 도메인을 포함하고, 면역글로불린 수퍼페밀리 및 다중쇄 면역 인식 수용체(MIRR) 패밀리 둘 모두의 구성원이다. 이것은 2개의 FcRγ 신호전달 사슬과 결합하여 신호를 보낸다.

[0217] Fc-알파/뮤 수용체(Fc α / μ R)는 타입 I 막 횡단 단백질이다. 이것은 IgM에 대한 친화도가 더 높지만 IgA에 결합할 수 있다(Shibuya and Honda (2006) *Springer Seminars in Immunopathology* 28 (4): 377-82). 그의 세포 외 부분에 하나의 Ig 유사 도메인이 있는 경우, 이 Fc 수용체는 또한 면역글로불린 수퍼페밀리의 구성원이다.

- [0219] Fc ε R에는 2개의 알려진 유형이 존재한다. 고친화도 수용체 Fc ε RI은 면역글로불린 수퍼페밀리의 구성원이다(이는 2개의 Ig 유사 도메인을 가짐). Fc ε RI은 표피 랑게르ハン스 세포, 호산구, 비만 세포 및 호염기구에서 발견된다. 이 수용체는 알레르기 반응을 제어하는 역할을 수행할 수 있다. Fc ε RI은 또한 항원 제시 세포에서 발현되고, 면역 매개체, 예를 들어 염증을 촉진하는 사이토카인의 생산을 제어한다(von Bubnoff et al. (2003) *Clinical and Experimental Dermatology* 28 (2): 184-7). 저친화도 수용체인 Fc ε RII(CD23)는 C형 헥틴이다. Fc ε RII는 막 결합된 또는 가용성 수용체로서 다수의 기능을 갖는다. 또한, 이것은 B 세포의 성장 및 분화를 제어하고, 호산구, 단핵구 및 호염기구의 IgE 결합을 차단할 수 있다(Kikutani et al. (1989) *Ciba Foundation Symposium* 147: 23-31).
- [0220] 한 실시양태에서, Fc 영역은 Fcab 단편을 생성하기 위해 항원 결합 부위를 함유하도록 조작될 수 있다(Wozniak-Knopp et al. (2010) *Protein Eng Des* 23 (4): 289-297). Fcab 단편은 Fc 영역을 교환함으로써 완전한 면역글로불린에 삽입되어 이중특이적 항체(별개의 결합 부위를 함유하는 Fab 및 Fcab 영역 둘 모두를 갖는)를 수득할 수 있다.
- [0221] FcRn의 결합 및 재순환은 아래에서 설명되어 있다. 예를 들어, IgG 및 알부민은 음세포 작용을 통해 혈관 내피 세포로 내재화된다. 엔도솜의 pH는 6.0이며, 막 결합된 FcRn과의 결합을 용이하게 한다. 엔도솜의 내용물은 다음과 같은 두 가지 방법 중 하나의 방법으로 처리할 수 있다: 다시 선단 세포(apical cell) 막으로 재순환시키거나 선단 측면으로부터 기저 측면(basolateral side)으로의 트랜스시토시스. FcRn과 결합하지 않은 IgG는 리소솜에 의해 분해된다.
- [0222] 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, IgG와 FcRn의 상호작용은 Fc를 통해 매개되는 것으로 생각된다. FcRn에 대한 Fc의 결합은 pH 특이적이고, 예를 들어, pH 7.4에서는 유의한 결합이 발생하지 않고, 산성 환경에서 강한 결합이 발생한다. IgG1 분자의 Fc 도메인과 복합체를 형성한 FcRn의 구조는 도 1에 제시되어 있다. 각각의 FcRn 분자는 일반적으로 Fc-단량체에 결합한다. 한 실시양태에서, Fab 도메인은 또한 FcRn에 대한 IgG의 결합에 영향을 미칠 수 있으며, 예를 들어 FcRn에 대한 IgG의 친화도에 부정적인 영향을 미치거나 영향을 미치지 않을 수 있다.
- [0223] 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위해 Fc 영역이 조작되는 경우에는 여러 고려 사항이 있을 수 있다. 예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질의 반감기 및 효율적인 재순환을 연장하기 위해서는 종종 pH 특이적 친화도 향상(예를 들어, 엔도솜의 낮은 pH에서만)이 필요하다. FcRn은 Fc 영역의 CH2와 CH3 도메인 사이의 링커 영역에 인접하여 결합한다. 링커에 대한 변형은 Fc γ 수용체에 대한 Fc의 결합에 영향을 미칠 수 있다. Fc 영역에 대한 변형은 폴리펩티드의 열 안정성 및 응집성에 영향을 미칠 수 있다.
- [0224] *FcRn 결합 최적화: 다른 이펙터 기능에 대한 영향 감소*
- [0225] 한 실시양태에서, 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 동일한 친화도 기능을 갖거나, 이펙터 기능(예를 들어, 본원에서 설명되는 이펙터 기능)을 실질적으로 변경하지 않는다(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 초과로 감소시킨다). 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 Fc 영역과 FcRn 사이의 결합과 관련이 없다.
- [0226] 돌연변이될 아미노산 잔기는 적어도 부분적으로는, Fc 영역 상의 하나 이상의 결합 부위의 구조적 또는 기능적 특성에 기초하여 선택될 수 있다. 이러한 결합 부위는 예를 들어 도 2에 도시된 바와 같이 단백질 A 결합 부위, C1q 결합 부위, Fc γ RI 결합 부위, Fc γ RIIa 결합 부위, Fc γ RIIIa 결합 부위 또는 FcRn 결합 부위를 포함한다. 결합 부위는 또한 TRIM21 결합 부위, 예를 들어 IgG의 루프 308-316, 루프 252-256 또는 루프 429-436으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CH2 도메인과 CH3 도메인 사이의 링커 영역은 CH2 도메인의 역학에 영향을 미쳐 Fc γ R 결합에 영향을 줄 수 있다.
- [0227] *FcRn의 pH 특이적 결합을 위한 구조적 기초*
- [0228] 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, 엔도솜의 낮은 pH는 CH2 및 CH3 도메인 상의 표면 히스티딘의 양성자화를 일으키는 것으로 생각된다. 예를 들어, CH2 상의 잔기 H310 및/또는 CH3 상의 H433의 양성자화는 FcRn 결합을 위해, 예를 들어 낮은 pH(예를 들어, pH 6.0)에서 중요할 수 있다. 양성자화는 또한 용매 또는 리간드 분자 결합에 대한 링커 영역의 더 나은 노출 또는 차폐와 같은, 영역의 입체형태적 역동성의 변화로 이어질 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 잔기 H310에서의 돌연변이, 잔기 H433에서의 돌연변이 또는 둘 모두를 포함한다. 잔기 H310 및/또는 H433에 인접한 하나 이상의 잔기가 또한 돌연변이될 수 있다. 폴리펩티드는 또한 보상성 또는 유익성 돌연변이, 예를 들어 돌연변이의 부정적인 결과

를 감소시키기 위해 임의의 상기 돌연변이에 대한 보상성 또는 유익성 돌연변이(예를 들어, 극성 대 비극성, 하전 대 비하전, 양하전(염기성) 대 음하전(산성), 또는 소수성 대 친수성)를 포함할 수 있다. 예를 들어, P247D는 보상성 또는 유익성 돌연변이일 수 있다.

[0229] 한 실시양태에서, 히스티딘의 양성자화는 예를 들어, 링커/CH₂/CH₃ 계면 잔기의 이동/변위를 포함하는 추가의 입체형태적 변화를 초래할 수 있다. Fc 단편의 결정 구조는 상이한 pH에서 결정화되었다. 도 3에 도시된 바와 같이, pH 6.5(시안) 및 5.0(녹색)에서 결정화된 Fc 단편의 2개의 고해상도 결정 구조의 분석은 잠재적인 차이를 나타내었다.

[0230] *Fc-FcRn 상호작용 계면의 매핑*

[0231] 한 실시양태에서, 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 Fc 영역과 FcRn 사이의 상호작용을 변경할 수 있는 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 적어도 부분적으로는, Fc-FcRn 상호작용 계면의 구조적 특징에 기초하여 선택된다.

[0232] 한 실시양태에서, 면역글로불린 단량체의 Fc 영역은 도 4에 도시된 구조를 가질 수 있다. 도 4에 도시된 바와 같이, 검은 점선은 Fc-FcRn 상호작용 계면을 나타낸다. 상기 구조는 예를 들어, 본원에서 설명되는 바와 같이, FcRn 접촉 잔기 및 FcRn 친화도 향상 Fc 잔기를 포함한다. CH₂ 및 CH₃ 도메인에 각각 위치하는 잔기 H310 및 H435는 주로 pH 의존성 Fc-FcRn 상호작용을 담당한다. 한 실시양태에서, FcRn은 그의 CH₂ 도메인과 CH₃ 도메인 사이의 Fc 영역에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, Fc-FcRn 결합 부위는 Fc 단량체의 CH₂ 및 CH₃ 도메인 둘 모두에 걸쳐 위치한다.

[0233] *Fc-FcRn 결합의 네트워크 도면은 아미노산의 동시 치환에 대한 통찰력을 제공한다*

[0234] 한 실시양태에서, 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 Fc 영역과 FcRn 사이의 상호작용을 변경할 수 있는 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 적어도 부분적으로는, Fc-FcRn 상호작용의 네트워크 도면에 기초하여 선택된다.

[0235] 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, 한 실시양태에서 잔기 H310은 예를 들어 Fc-FcRn 복합체의 네트워크 분석에 의해 결정된 바와 같이, FcRn과 결합할 때 중추적인 역할을 수행하는 것으로 생각된다. 도 5에 도시된 바와 같이, 잔기 H310은 다수의 다른 고도로 네트워크화된 잔기와 고도로 상호 연결되어 있다. 한 실시양태에서, H310 클러스터에서의 돌연변이 및 이웃하는(연결된 노드) 돌연변이는 H310 네트워크를 강화할 수 있다. 하위 네트워크의 분석은 다른 Fc 잔기에 대한 영향을 감소시키거나 최소화하면서 유리한 FcRn 상호작용을 위한 상승작용성 돌연변이의 도입을 보여준다.

[0236] *FcRn 결합의 최적화를 위한 설계 고려 사항*

[0237] 한 실시양태에서, 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 Fc-FcRn 결합을 최적화하기 위해 설계될 수 있다.

[0238] 한 실시양태에서, Fc 영역에 돌연변이를 갖는 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드(예를 들어, 돌연변이를 제외하고 동일한 폴리펩티드)에 비해 pH 특이적 친화도 향상을 보인다. 한 실시양태에서, 친화도 향상은 반 데르 바알 상호작용을 증가시킴으로써 달성된다. 한 실시양태에서, 친화도 향상은 수소 결합 및/또는 정전기적 상호작용의 도입에 의해 달성되지 않는다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 CH₂ 도메인과 CH₃ 도메인 사이의 링커 영역의 입체형태를 변경하지 않거나, 감소된 또는 최소 변동을 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 두 도메인(4개의 사분면)에 걸친 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 표면 상에 소수성 또는 방향족 잔기의 큰 클러스터를 함유하지 않는다.

[0239] 한 실시양태에서, 상기 폴리펩티드는 Fc 영역과 FcRn 사이의 상호작용의 강도를 향상시키거나, 예를 들어 산성 pH에서 FcRn에 대한 해리 상수(K_d)를 감소시키는 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 산성 pH에서 FcRn에 대한 해리 속도(k_{off})를 감소시키는 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 산성 pH에서 FcRn에 대한 해리 속도(k_{off})를 감소시키고 FcRn에 대한 회합 속도(k_{on})를 증가시키는 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 예를 들어 산성 pH에서 FcRn에 대한 해리 속도(k_{off})를 감소시키고 FcRn에 대한 회합 속도(k_{on})에 영향을 주지 않거나 유의한 영향을 주지 않는 돌연변이를 포함한다. 이론에 구속되기를 바라지 않지만, 한 실시양태에서 FcRn에 대한 해리 상수 K_d 의 감소는 회합 속도(k_o

n)의 증가보다는, 주로 FcRn에 대한 해리 속도(k{off})의 감소에 기인하는 것으로 생각된다.

[0240] 실험 평가: 다차원을 따라 및 상이한 검정 플랫폼에 의해 평가된 Fc 돌연변이

[0241] 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 다수의 방법으로 평가할 수 있다. pH-특이적 Fc-FcRn 결합(예를 들어, pH6.0 및 pH7.4에서의 결합)은 옥텟 기반 분석, 경쟁 검정(예를 들어, 유동 세포 계측법) 또는 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 결정될 수 있다.

[0242] 생물물리학적 특성화(예를 들어, 열 안정성, 응집 또는 발현)를 수행할 수 있다. 열 안정성은 예를 들어 시프로 오렌지에 의해 결정될 수 있다. 응집은 예를 들어 SEC 또는 RP-HPLC로 측정할 수 있다.

[0243] 예를 들어, Fc γ RI(예를 들어, 옥텟 기반 검정에 의한), Fc γ RIIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb(예를 들어, ELISA에 의한), C1q, ADCC 또는 CDC에 관련된 이펙터 기능을 시험할 수 있다.

[0244] 3부분의 모티프 함유 단백질 21(TRIM21: Tripartite Motif-Containing Protein 21) 결합을 시험할 수 있다. TRIM21은 IgG의 Fc와 결합하는 시토졸 수용체이다. TRIM21은 바이러스, 박테리아 및 진균과 같은 Fc 결합 병원체의 세포내 인식 및 중화를 매개하는 역할을 수행한다. 예를 들어, TRIM21은 비외피성 바이러스의 중화에서 중요한 역할을 수행한다(McEwan *et al.* *Nat Immunol.* 2013; 14(4):327-36). 그 역할은 분해를 위한 면역 복합체의 유도를 포함하도록 더욱 확장되었다(McEwan *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(3):574-579). TRIM21은 FcRn 결합 부위와 중첩되는 항체 Fc 영역의 CH2:CH3 계면에 결합한다. FcRn 친화도를 증가시키는 일부 Fc 돌연변이는 TRIM21 친화도를 감소시킨다(Foss *et al.* *J Immunol.* 2016; 196(8):3452-3459). 주요 접촉 잔기는 예를 들어 위치 253, 433, 434 및 435를 포함한다. LS 변이체(M428L/N434S)는 위치 434에 돌연변이를 포함하고, N434S 돌연변이가 TRIM21 결합을 10배 감소시키는 것으로 밝혀졌다. TRIM21 매개 중화는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN)로 알려져 있다.

[0245] 점막 흡수를 시험할 수 있다. FcRn은 장 및 폐포 표면을 감싸는 점막 상피와 같은 상이한 세포 장벽을 가로질러 IgG를 운반한다. FcRn 결합의 변형은 면역 보호를 부여하는 점막 국소화를 향상시키는 메커니즘을 제공한다.

[0246] 폴리펩티드의 반감기는 예를 들어 트랜스제닉 마우스(예를 들어, 잭슨(Jackson) 연구소의 Tg32 및 Tg276 마우스) 또는 영장류(예를 들어, 사이노몰거스 원숭이)에서 측정될 수 있다.

[0247] 예시적인 검정은 다음과 같이 보다 상세히 설명된다:

[0248] 1. FcRn 결합 검정

[0249] a. NiNTA 바이오센서에 대한 FcRn의 고정을 이용한 옥텟 검정

[0250] 6x 히스티딘 태그(서열 번호 2)를 통해 FcRn을 NiNTA 바이오센서에 고정시킴으로써, 산성(pH 6.0) 및 생리학적(pH 7.4) 조건 하에서 IgG 분자에 결합하는 것을 후속적으로 조사할 수 있다. 이 전략은 이전에 문헌에 서술된 바 있고(1), 이 방법은 언급된 프로토콜의 적용을 상세하게 설명한다. 간단히 설명하면, 5 μg/mL의 재조합 인간 FcRn을 NiNTA 바이오센서 상에 180초 동안 로딩한다. 1x PBS(pH 6.0)에서 60 초의 기준선 단계 후에, FcRn 로딩된 팁을 250 nM(37.5 μg/mL)의 농도로 60초 동안 IgG에 노출시킨 후, PBS(pH 6.0)에서 60초 동안 해리시키고, PBS(pH 7.4)에서 추가로 30초 동안 해리시킨다. 검정 완료 후, pH 6.0에서의 친화도 상수(K_D)의 정량적 평가를 ForteBio 옥텟 소프트웨어를 사용하여 수행하고, 정성적 평가는 pH 6.0에서의 FcRn에 대한 IgG의 회합 및 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 후속 해리를 시각화하는, 시간 경과에 따른 반응 속도를 플로팅함으로써 수행된다.

[0251] b. 항-CH1 바이오센서에 대한 IgG의 고정을 이용한 옥텟 검정

[0252] 항-CH1 바이오센서에 IgG를 고정시킴으로써, 산성(pH 6.0) 및 생리학적(pH 7.4) 조건 하에서 FcRn 분자에 결합하는 것을 후속적으로 조사할 수 있다. 이 전략은 이전에 문헌에 서술된 바 있고(2), 이 방법은 언급된 프로토콜의 적용을 상세하게 설명한다. 간단히 설명하면, 5 μg/mL의 정제된 IgG를 항-CH1 바이오센서 상에 180초 동안 로딩한다. 1x PBS(pH 6.0)에서 60초의 기준선 단계 후에, IgG 로딩된 팁을 50 μg/mL의 농도로 60초 동안 FcRn에 노출시킨 후, PBS(pH 6.0)에서 60초 동안 해리시키고, PBS(pH 7.4)에서 추가로 30초 동안 해리시킨다. 검정 완료 후, pH 6.0에서의 친화도 상수(K_D)의 정량적 평가를 ForteBio 옥텟 소프트웨어를 사용하여 수행하고, 정성적 평가는 pH 6.0에서의 FcRn에 대한 IgG의 회합 및 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 후속 해리를 시각화하는, 시간 경과에 따른 반응 속도를 플로팅함으로써 수행된다.

[0253] c. 세포 기반 검정

[0254] 세포 기반 검정은 또한 FcRn과 IgG 사이의 상호작용을 분석하기 위해 사용된다(Ref: PMID: 23384837). 세포 표면 상의 막 고정된 FcRn의 발현은 원형질막 및 분자 배향이 FcRn과 IgG 사이의 상호작용에 영향을 미치는 FcRn의 생리학적 제시를 밀접하게 나타낸다. 여기서 사용된 검정은 관심 있는 IgG가 형광 표지된 고친화도 Fc 경쟁 물질 시약(Fc-A488)의 세포 결합과 경쟁하는 능력에 대해 평가되는 경쟁 검정이다. 막 결합된 전장 FcRn 이종이량체를 발현하는 Expi293 세포를 고정된 농도의 Fc-A488(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 다양한 농도의 관심 있는 IgG(0.001–10 μM)의 혼합물과 함께 인큐베이팅한다. 세포 결합 형광은 유동 세포 계측법에 의해 검출된다. FcRn에 대한 결합이 개선된 IgG는 보다 낮은 IgG 농도에서 Fc 경쟁 물질과 경쟁할 것이다. 이 검정은 견고하고, 선형이며, 특이적이고, FcRn에 대한 IgG/Fc 변이체의 상대적인 결합의 차이를 나타내기 위해 사용될 수 있다.

[0255] 2. 열 안정성 검정

[0256] IgG 변이체의 안정성은 열 스트레스 하에서 단백질 언폴딩(unfolding)을 모니터링하기 위해 시프로® 오렌지 염료를 사용하는 검정인 시차 주사 형광 측정법(DSF: Differential Scanning Fluorimetry)에 의해 평가되었다. 시프로® 오렌지는 소수성 표면에 비특이적으로 결합하고 그의 형광은 수성 환경에서 급속히 감소되는 형광 염료이다. 단백질은 온도가 상승함에 따라 그의 2차 구조를 잃고 언폴딩되기 시작하여 소수성 핵심 잔기를 노출하고 염료가 형광을 내도록 한다. 최대 형광 신호는 완전한 언폴딩시에 얻게 되고, 그 후에 단백질이 응집하기 시작하여 노출된 소수성 잔기가 감소하고, 따라서 형광 신호가 감소한다. 천연 상태와 완전히 언폴딩된 단백질 사이의 중간 지점에는 전이 온도 또는 융점(T_m)이 존재하고, 이 온도는 단백질 구축물 또는 제제 조건을 상대적인 안정성에 대해 직접 비교하기 위해 사용할 수 있다.

[0257] 한 실시양태에서, FcRn 결합 이외의 인자가 또한 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 관찰된 반감기에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 인자는 예를 들어 응집 경향, 비특이적 결합, 안정성 또는 Fab 조성을 포함할 수 있다.

[0258] 한 실시양태에서, 예를 들어 최적 미만의(suboptimal) 주형에서 실질적으로 개선된 반감기를 제공하기 위해 비-Fc 영역에 돌연변이가 도입된다. 예를 들어, 낮은 시작 반감기를 갖는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 최적 미만의 특성의 존재를 나타낼 수 있다. 조작 노력은 또한 예를 들어 필수 결합 프로파일(예를 들어, 친화도 및/또는 특이성)을 유지하거나 적합한 현상성 특성(예를 들어, 안정성, 용해도, 발현 수준 또는 응집)을 얻기 위해, 보다 낮은 반감기의 근본 원인을 완화하는데 중점을 둘 수 있다. 한 실시양태에서, 최대의 반감기 연장을 실현하기 위해 최적 미만의 생물학적 특성을 갖는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)에 대한 추가의 조작 수행된다.

2. 약동학

[0259] [0260] 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 하나 이상의 바람직한 약동학적 특성, 예를 들어, 본원에서 설명되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 약동학적 특성을 가질 수 있다.

[0261] 약동학(PK)은 살아있는 유기체에 투여되는 물질의 운명을 결정하기 위해 사용될 수 있다. PK 연구는 약물 대사를 분석하고 약물이 투여되는 순간부터 약물이 신체로부터 완전히 제거되는 시점까지 약물의 운명을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 약동학은 예를 들어 흡수 및 분배 메커니즘을 통해 투여 후 특정 약물에 대해, 또는 체내 물질의 화학적 변화(예를 들어, 시토크롬 P450 또는 글루쿠로노실트랜스퍼라제 효소와 같은 대사 효소에 의한), 또는 약물의 대사산물의 효과 및 배설 경로에 대해 신체가 어떻게 영향을 미치는지 설명한다. 약물의 약동학적 특성은 흡수율에 영향을 미칠 수 있는 투여 부위 및 투여된 약물의 용량과 같은 요소에 의해 영향을 받을 수 있다. 약동학은 약역학(예를 들어, 약물의 생화학적 및 생리학적 효과에 대한 연구)과 함께 분석될 수 있다.

[0262] 약동학을 위해 다수의 상이한 모델이 개발되었다. 예를 들어, 약동학적 모델링은 비구획(noncompartmental) 방법 또는 구획 방법으로 수행될 수 있다.

[0263] 비구획 방법은 농도-시간 그래프의 곡선 하 면적을 추정함으로써 약물에 대한 노출을 추정한다. 비구획 PK 분석은 총 약물 노출의 평가에 크게 의존한다. 총 약물 노출은 종종 사다리꼴 규칙(수치 적분)을 사용하는 가장 일반적인 방법인 곡선 하 면적(AUC) 방법에 의해 평가된다. 사다리꼴 규칙에서 'x'의 길이에 의존하기 때문에, 면적 추정은 혈액/혈장 샘플 추출 스케줄에 크게 의존한다. 즉, 가까운 시점 일수록 사다리꼴이 농도-시간 곡선의 실제 모양을 보다 근접하게 반영한다.

- [0264] 구획 방법은 동역학 모델을 사용하여 농도-시간 그래프를 추정한다. 구획 PK 분석은 동역학 모델을 사용하여 농도-시간 곡선을 기술하고 예측한다. PK 구획 모델은 종종 화학 반응 동역학 및 열역학과 같은 다른 과학 분야에서 사용되는 동역학 모델과 유사하다. 일부 비구획 분석에 대한 구획 분석의 이점은 언제든지 농도를 예측할 수 있는 능력이다. 곡선 스트리핑(curve stripping)을 기초로 한 구획 배제 모델링(compartment-free modelling)은 이러한 제한을 받지 않는다. 가장 단순한 PK 구획 모델은 IV 볼러스 투여 및 1차 제거를 사용하는 1구획 PK 모델이다. 보다 복잡한 PK 모델(예를 들어, PBPK 모델)은 개발 및 검증을 용이하게 하기 위해 생리학적 정보를 사용하는 것에 의존한다.
- [0265] 단일 구획 모델에서 관련된 여러 요인들(예를 들어, 용량, 혈장 농도 또는 제거) 사이의 관계 그래프는 직선 또는 근사치(즉, 선형 약동학)를 제공한다. 약물이 효과적이기 위해서는 혈장으로부터 다른 체액 및 조직으로 빠르게 이동할 수 있어야 한다.
- [0266] 다중 구획 모델에서, 다양한 요인들 사이의 비선형 관계에 대한 그래프는 곡선으로 표현되고, 상이한 곡선 하면적의 크기를 계산함으로써 요인 사이의 관계를 찾을 수 있다. 비선형 약동학에서 사용된 모델은 주로 미카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 동역학에 기초한다.
- [0267] 모델이 나누어진 다양한 구획은 통상적으로 ADME 체계로 언급된다(방출이 흡수로부터 분리된 단계로서 포함되는 경우 LADME로도 언급됨): 방출(예를 들어, 약학 제제로부터 약물을 방출하는 과정); 흡수(예를 들어, 물질이 혈액 순환계로 들어가는 과정); 분배(예를 들어, 신체의 체액 및 조직 전체에 걸친 물질의 분산 또는 보급); 대사(또는 생체 변환 또는 불활성화)(예를 들어, 유기체에 의한 외래 물질의 존재 인식 및 모 화합물의 딸 대사산물로의 비가역적인 변환); 및 배설(예를 들어, 신체로부터 물질의 제거). 드문 경우에, 일부 약물은 신체 조직에 비가역적으로 축적된다. 대사 및 배설의 두 단계는 제거라는 표제 하에 함께 분류될 수 있다.
- [0268] 이를 모든 파라미터는 상응하는 그래프 표현이 있는 수식을 통해 제시될 수 있다. 이를 모델의 사용은 산 해리 상수(pK_a), 생체 이용률 및 용해도, 흡수 용량 및 유기체에서의 분포와 같은 그의 기본적인 특성의 일부에 대한 정보를 고려하여 특정 약물이 거동하는 방식뿐만 아니라, 분자의 특성에 대한 이해를 허용한다.
- [0269] 약물에 대한 모델 결과는 산업계에서(예를 들어, 제네릭 의약품을 설계할 때 생물학적 동등성을 계산할 때) 또는 약동학적 개념의 임상 적용시에 사용될 수 있다. 임상 약동학은 인간 건강 전문가에게 및 수의학에서 약물의 효과적이고 효율적인 사용을 위한 많은 수행 지침을 제공한다.
- [0270] 예시적인 약동학적 특성은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 용량(예를 들어, 투여된 약물의 양), 투여 간격(예를 들어, 약물 투여 사이의 시간), C_{max} (예를 들어, 투여 후 약물의 최대 혈장 농도), t_{max} (예를 들어, C_{max} 에 도달하는 시간), C_{min} (예를 들어, 다음 용량을 투여하기 전에 약물이 도달하는 최저 농도), 분배 용량(예를 들어, 약물 농도를 체내의 약물의 양과 관련시키는, 약물이 분배되는 걸보기 부피), 농도(예를 들어, 혈장의 주어진 부피 내의 약물의 양), 반감기 또는 제거 반감기(예를 들어, 약물 농도가 그의 원래의 값의 절반에 도달하는 데 필요한 시간), 제거 속도 상수(예를 들어, 약물이 체내에서 제거되는 속도), 주입 속도(예를 들어, 제거와 균형을 이루기 위해 필요한 주입 속도), 곡선 하면적(예를 들어, 단일 투여 후 또는 정상 상태에서 농도-시간 곡선의 적분), 제거율(예를 들어, 단위 시간당 약물이 제거된 혈장의 부피), 생체 이용률(예를 들어, 전신적으로 이용 가능한 약물의 비율), 또는 변동(예를 들어, 정상 상태에서 한 투여 간격 내에서의 최대 최저(peak trough) 변동).
- [0271] 약동학적 특성은 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 생물 분석 방법을 사용하여 농도-시간 프로파일을 작성할 수 있다. 화학적 기술은 생물학적 기질, 예를 들어 혈장에서 약물의 농도를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 적절한 생물 분석 방법은 선택적이고 민감해야 한다. 예를 들어, 그의 표적에 대한 약물의 친화도에 생물학적 기질/액체가 어떤 영향을 미치는지를 정량하기 위해 마이크로 단위 열 영동(microscale thermophoresis)을 사용할 수 있다(Baaske et al. (2010). *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (12): 1-5; Wienken et al. (2010). *Nature Communications* 1 (7): 100).
- [0272] 약동학적 특성은 예를 들어 저용량 및 장시간 투여 후에 농도를 관찰하기 위해 고감도가 필요할 때, 질량 분광 분석법을 사용하여 연구할 수 있다. 이 용도에 사용되는 일반적인 계측기는 삼중형 사중극자(triple quadrupole) 질량 분광 분석기가 있는 LC-MS이다. 팬덤 질량 분광 분석법은 추가된 특이성을 위해 사용될 수 있다. 표준 곡선 및 내부 표준물질은 샘플에서 의약품의 정량을 위해 사용할 수 있다. 샘플은 의약품이 투여된 후 신체로부터 대사되거나 제거될 때 상이한 시점을 나타낸다. 투여 전에 채취한 블랭크 샘플을 사용하여 배경을 결정하고 복잡한 샘플 매트릭스에 대한 데이터 무결성을 보장한다. 표준 곡선은 선형일 수 있거나, 또는 대부분

의 질량 분광 분석기의 응답이 큰 농도 범위에 걸쳐 선형보다 작기 때문에 2차 계수와 같은 보다 복잡한 함수와 함께 곡선 과정이 사용될 수 있다(Hsieh and Korfomacher (2006) Current Drug Metabolism 7 (5): 479-89; Covey et al. (1986) Anal. Chem. 58 (12): 2453-60; Covey et al. (1985). Anal. Chem. 57 (2): 474-81).

[0273] 예시적인 항체 분자

[0274] 본원에서 설명되는 방법은 다양한 항체 분자, 예를 들어 Fc 영역을 함유하는 임의의 항체 분자를 조작하기 위해 사용될 수 있다.

[0275] 한 실시양태에서, 항체 분자는 키메라 항체 분자, 인간화 항체 분자 또는 인간 항체 분자이다.

[0276] 한 실시양태에서, 항체 분자는 전체 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 Fc 영역을 함유하지 않는 항체 분자의 Fc 영역 함유 유도체(예를 들어, 본원에서 설명되는 항원 결합 단편)이다. 예시적인 항원 결합 단편은 Fab, F(ab')2, Fab', scFv, 디-scFv 또는 sdAb를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 이중특이적 모노클로날 항체, 예를 들어 3기능성 항체(3funct) 또는 이중특이적 T 세포 결합체(BiTTE)이다.

[0277] 한 실시양태에서, 항체 분자는 감염성 질환(예를 들어, 바이러스 감염, 박테리아 감염 또는 진균 감염)과 관련된 분자(예를 들어, 단백질)를 표적으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 암과 관련된 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 면역 질환과 관련된 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 심혈관 질환과 관련된 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 대사 장애와 관련된 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포를 표적으로 한다.

[0278] 또 다른 실시양태에서, 항체 분자는 신경 장애와 관련된 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포를 표적으로 한다.

[0279] 예시적인 항체 분자는 다음 분자 또는 세포 중 하나 이상(예를 들어, 2개)을 표적으로하는 항체 분자를 포함하고 이로 제한되지 않는다: β -아밀로이드, 4-1BB, 5AC, 5T4, ACF9, ACFIX, 악티빈 수용체 유사 키나제 1, ACVR2B, 선암종 항원, AGS-22M6, 알파-태아단백질, 안지오포이에틴 2, 안지오포이에틴 3, 탄저병 독소의 보호 항원, AOC3(VAP-1), B7-H3, 바실러스 안트라시스(*bacillus anthracis*) 탄저병, BAFF, B-림프종 세포, C242 항원, C5, CA-125(이미타티온), 칼시토닌, 카니스 루푸스 파밀리아리스(*canis lupus familiaris*) IL31, 탄산 안히드라제 9(CA-IX), 심장 미오신, CCL11(에오탁신-1), CCR2, CCR4, CCR5, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD147(바시긴), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (IgE 수용체), CD25 (IL-2 수용체의 α 사슬), CD27, CD274, CD276, CD28, CD3, CD3 엡실론, CD30(TNFRSF8), CD33, CD37, CD38(시클릭 ADP 리보스 허드롤라제), CD4, CD40, CD40 리간드, CD41(인테그린 알파-IIb), CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD74, CD79B, CD80, CEA, CEA 관련 항원, CFD, CGRP, ch4D5, CLDN18.2, 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 응괴 인자 A, 응고 인자 III, CSF1R, CSF2, CTGF, CTLA-4, C-X-C 케모카인 수용체 타입 4, 사이토메갈로바이러스, 사이토메갈로바이러스 당단백질 B, 다비가트란, DLL3, DLL4, DPP4, DR5, 이. 콜라이(*E. coli*) 시가 독소 타입-1, 이. 콜라이 시가 독소 타입-2, EGFL7, EGFR, 엔도글린, 내독소, EpCAM, 에프린 수용체 A3, 에피시알린, ERBB3, 에서리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 호흡기 세포 융합 바이러스의 F 단백질, FAP, 피브린 II 베타 사슬, 피브로넥틴 엑스트라 도메인-B, 폴레이트 히드롤라제, 폴레이트 수용체 1, 폴레이트 수용체 알파, 프리즐드(Frizzled) 수용체, 강글리오시드 GD2, GCCR, GD2, GD3 강글리오시드, GDF-8, 글리피칸 3, GMCSF 수용체 α -사슬, GPNMB, 성장 분화 인자 8, GUCY2C, 혜마글루터닌, B 형 간염 표면 항원, B형 간염 바이러스, HER1, HER2/neu, HER3, HGF, HHGFR, 히스톤 복합체, HIV-1, HLA-DR, Hsp90, 인간 산란 인자 수용체 키나제, 인간 TNF, 인간 베타-아밀로이드, ICAM-1(CD54), ICOSL, IFN- γ , IFN- γ , IgE, IgE Fc 영역, IGF-1 수용체, IGF-I, IGHE, IL 20, IL-1, IL-12, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL2, IL-22, IL-23, IL23A, IL31RA, IL-4, IL-4, IL-5, IL6, IL-6 수 있다(IL6R), IL-9, ILGF2, 인플루엔자 A 바이러스 혜마글루터닌(HA), 인슐린 유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 α 4, 인테그린 α 4 β 7, 인테그린 α 5 β 1, 인테그린 α 7 β 7, 인테그린 α IIb β 3, 인테그린 α v β 3, 인터페론 알파 수용체, 인터페론 α / β 수용체, 인터페론 감마-유도 단백질, ITGA2, ITGB2(CD18), 칼리크레인, KIR2D, KLRC1, 루이스(Lewis)-Y 항원, LFA-1(CD11a), LFA-1(CD11a), LINGO-1, 리포테이코산, LOXL2, L-셀렉틴(CD62L), LTA, MCP-1, 메소텔린, MIF, MS4A1, MSLN, MUC1, 뮤신 CanAg, 미엘린-결합 당단백질, 미오스타틴, NCA-90(과립구 항원), NCA-90(과립구 항원), 신경 아폽토시스-조절 프로테이나제 1, 신경 아폽토시스-조절 프로테이나제 1, NGF, NGF, N-글리콜릴뉴라민산, NOGO-A, Notch 1, Notch 수용체, NRP1, 오릭톨라구스 쿠니쿨루스(*Oryctolagus cuniculus*), OX-40, oxLDL, PCSK9, PD-1, PDCD1, PDGF-R α , 포스페이트-소듐 공동-운반체, 포스파티딜세린, 혈소판-유래 성장 인자

수용체 베타, 전립선 암종 세포, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 아에루기노사 타입 III 분비 시스템, 광견병 바이러스 당단백질, 광견병 바이러스 당단백질, RANKL, 호흡기 세포 융합 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스, RHD, 레수스 인자(Rhesus factor), RON, RTN4, 스클레로스틴, SDC1, 셀렉틴 P, SLAMF7, SOST, 스팽고신-1-포스페이트, 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), STEAP1, TAG-72, T-세포 수용체, TEM1, 테나신 C, TFPI, TGF 베타 1, TGF 베타 2, TGF-β, TNFR 수퍼페밀리 구성원 4, TNF-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, MUC1의 종양 특이적 글리코실화, 종양-관련 칼슘 신호 전달 인자 2, TWEAK 수용체, TYRP1(당단백질 75), VEGFA, VEGFR-1, VEGFR2, 비멘틴, 및 VWF.

[0280]

예시적인 항체 분자는 다음 병원체(예를 들어, 박테리아, 바이러스 또는 진균) 중 하나 이상(예를 들어, 2개)을 표적으로 하는 항체 분자를 포함하고 이로 제한되지 않는다: 악티노마이세스 계렌세리애(*Actinomyces gerencseriae*), 악티노마이세스 이스라엘리이(*Actinomyces israelii*), 악티노미세토마(*Actinomycetoma*) 종, 알파바이러스, 아나플라스마 파고시토필룸(*Anaplasma phagocytophilum*), 안실로스트로마 브라질리엔세(*Ancylostoma braziliense*), 안실로스토마 두오데날레(*Ancylostoma duodenale*), 안지오스트롱길루스(*Angiostrongylus*), 아니사키스(*Anisakis*), 아르카노박테리움 헤몰리티쿰(*Arcanobacterium haemolyticum*), 아스카리스 룰브리코이데스(*Ascaris lumbricoides*), 아스페르길루스(*Aspergillus*) 종, 아스트로비리다에(*Astroviridae*) 과, 바베시아(*Babesia*) 종, 바실루스 안트라시스, 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*), 박테리아성 질염 미생물총, 박테로이데스(*Bacteroides*) 종, 발란티듐 콜라이(*Balantidium coli*), 바르토넬라(*Bartonella*), 바르토넬라 바실리포르미스(*Bartonella bacilliformis*), 바르토넬라 헨셀라에(*Bartonella henselae*), 바트라코키트리움 텐드라바티디스(*Batrachochytrium dendrobatidis*), 바일리사스카리스(*Baylisascaris*) 종, BK 바이러스, 블라스토시스티스(*Blastocystis*) 종, 블라스토미세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 아프젤리이(*Borrelia afzelii*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 가리니이(*Borrelia garinii*), 보렐리아 헤름시이(*Borrelia hermsii*), 보렐리아 레쿠렌티스(*Borrelia recurrentis*), 보렐리아(*Borrelia*) 종, 브루셀라(*Brucella*) 종, 브루기아 말레이이(*Brugia malayi*), 부니아비리다에(*Bunyaviridae*) 과, 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 부르크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*), 부르크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*), 부르크홀데리아(*Burkholderia*) 종, 칼리시비리다에(*Caliciviridae*) 과, 캄필로박터(*Campylobacter*) 종, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다(*Candida*) 종, 카필라리아 아에로필리아(*Capillaria aerophila*), 카필라리아 혜파티카(*Capillaria hepatica*), 카필라리아 필리피넨시스(*Capillaria philippinensis*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미도필라 뉴모니아에(*Chlamydophila pneumoniae*), 클라미도필라 프시타시(*Chlamydophila psittaci*), 클로노르키스 시넨시스(*Clonorchis sinensis*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 클로스트리디움 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 페르프린젠스, 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리디움(*Clostridium*) 종, 콕시디오이데스(*Coccidioides*) 종, 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 콕시디오이데스 포사다시이(*Coccidioides posadasii*), 콕시디오이데스 포사다시이(*Coccidioides posadasii*), 콜로라도 진드기 열 바이러스(*CTFV*), 코로나바이러스, 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*), 콕사키 A 바이러스 및 엔테로바이러스 71(EV71), 크리미아-콩고 출혈열 바이러스, 크립토코쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*) 종, 시클로스포라 카이에타넨시스(*Cyclospora cayetanensis*), 사이토메갈로바이러스, 뎅기 바이러스(DEN-1, DEN-2, DEN-3 또는 DEN-4), 디엔타모에바 프라길리스(*Dientamoeba fragilis*), 디필로보트리움(*Diphyllobothrium*), 드라쿤콜루스 메디넨시스(*Dracunculus medinensis*), 에볼라바이러스(EBOV), 에키노코쿠스(*Echinococcus*) 종, 에를리키아 샤퐁시스(*Ehrlichia chaffeensis*), 에를리키아 에윈기이(*Ehrlichia ewingii*), 에를리키아(*Ehrlichia*) 종, 엔타모에바 히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*), 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*) 과, 엔테로바이러스, 엔토모프토랄레스(*Entomophthorales*) 목(엔토모프토라진균증(*Entomophthoramycosis*)), 에피데르모피톤 플로코숨(*Epidermophyton floccosum*), 앰스타인-바 바이러스(EBV: Epstein-Barr Virus), 에서리키아 콜라이 0157:H7, 유미세토마(*Eumycetoma*) 종, 파스시올라 혜파티카(*Fasciola hepatica*) 및 파스시올라 자이언티카(*Fasciola gigantica*), 파스시올롭시스 부스키(*Fasciolopsis buski*), 필라리오이데아(*Filarioidea*) 상과, 플라비바이러스(*Flavivirus*), 폰세카야에 페드로소이(*Fonsecaea pedrosoi*), 프란시셀라 틀라렌시스(*Francisella tularensis*), 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 종, 게오토리쿰 칸디둠(*Geotrichum candidum*), 기아르디아 람블리

아(*Giardia lamblia*), 그나토스토마 히스피둠(*Gnathostoma hispidum*), 그나토스토마 스피니게룸(*Gnathostoma spinigerum*), 녹조류 데스모데스무스 아르마투스(*Desmodesmus armatus*), A군 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 구아나리토(*Guanarito*) 바이러스, 혼모필루스 두크레이이(*Haemophilus ducreyi*), 혼모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*), 하트란드(*Heartland*) 바이러스, 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 헤르페스 심플렉스(*Herpes simplex*) 바이러스 1 및 2(HSV-1 및 HSV-2), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), HIV(인간 면역결핍 바이러스), 호르타에아 웨르넥키이(*Hortaea werneckii*), 인간 보카바이러스(HBoV), 인간 헤르페스바이러스 6(HHV-6) 및 인간 헤르페스바이러스 7(HHV-7), 인간 메타뉴모바이러스(hMPV), 인간 유두종바이러스(HPV), 인간 파라인플루엔자 바이러스(HPIV), 히메놀레피스 디미누타(*Hymenolepis diminuta*), 히메놀레피스 나나(*Hymenolepis nana*), 이소스포라 벨리(*Isospora bellii*), JC 바이러스, 주닌(*Junin*) 바이러스, 칸겔라 킨가에(*Kingella kingae*), 클레브시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*), 라싸(Lassa) 바이러스, 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 레슈마니아(*Leishmania*) 종, 렘토스파라(*Leptospira*) 종, 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 럼프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 마추포(*Machupo*) 바이러스, 말라세지아(*Malassezia*) 종, 마르부르그(*Marburg*) 바이러스, 홍역 바이러스, 홍역 바이러스, 메타고니무스 요카가와이(*Metagonimus yokagawai*), 마이크로스포리디아 필룸(*Microsporidia phylum*), 중동 호흡기 증후군 코로나 바이러스, 몰루스콤 콘타기오슘 바이러스(MCV), 원두증 바이러스, 무코랄레스(*Mucorales*) 목(모균증), 볼거리 바이러스, 미코박테리움 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 미코박테리움 레프로마토시스(*Mycobacterium lepromatosis*), 미코박테리움 투베르콜로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 미코박테리움 올세란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코플라즈마 뉴모니아에(*Mycoplasma pneumoniae*), 나에글레리아 포울레리(*Naegleria fowleri*), 네카토르 아메리카누스(*Necator americanus*), 네이세리아 고노로에아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 고노로에아에, 네이세리아 메닌기티디스(*Neisseria meningitidis*), 노카디아 아스테로이데스(*Nocardia asteroides*), 노카디아(*Nocardia*) 종, 0111 및 0104:H4, 온코세르카 볼부루스(*Onchocerca volvulus*), 온코세르카 볼불루스(*Onchocerca volvulus*), 오피스토르키스 펠리네우스(*Opisthorchis felineus*), 오피스토르키스 비베리니(*Opisthorchis viverrini*), 오르토믹소비리다에(*Orthomyxoviridae*) 과, 파라콕시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 파라고니무스 웨스테르만니(*Paragonimus westermani*), 파라고니무스(*Paragonimus*) 종, 기생성 쌍시류 파리 유충, 파보바이러스(*Parvovirus*) B19, 파스테우렐라(*Pasteurella*) 종, 페디콜루스 휴마누스 카피티스(*Pediculus humanus capitis*), 페디콜루스 휴마누스 코르포리스(*Pediculus humanus corporis*), 프티루스 푸비스(*Phthirus pubis*), 페에드라이아 호르타에(*Piedraia hortae*), 플라스모디움(*Plasmodium*) 종, 뉴모시티스 지로베시이(*Pneumocystis jirovecii*), 폴리오바이러스(*Poliovirus*), 프레보텔라(*Prevotella*) 종, PRNP, 프로피오니박테리움 프로피오니쿠스(*Propionibacterium propionicus*), 광견병 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스(RSV), 리노스포리디움 세에베리(*Rhinosporidium seeberi*), 리노바이러스(*Rhinovirus*), 리노바이러스, 리케챠(*Rickettsia*), 리케챠 아카리(*Rickettsia akari*), 리케챠 프로와제키이(*Rickettsia prowazekii*), 리케챠 리케치이(*Rickettsia rickettsii*), 리케챠 티피(*Rickettsia typhi*), 리케챠 종, 리프트 계곡(Rift Valley) 열 바이러스, 로타바이러스(*Rotavirus*), 풍진 바이러스, 사비아(*Sabia*), 살모넬라 엔테리카 아종 엔테리카(*Salmonella enterica* subsp. *enterica*), 살모넬라(*Salmonella*) 종, 사르코프테스 스카비에이(*Sarcoptes scabiei*), SARS 코로나바이러스, 스키스토소마(*Schistosoma*) 종, 혈청형 티피(serovar typhi), 시겔라(*Shigella*) 종, 신 놈브래(Sin Nombre) 바이러스, 스포로트릭스 스첸키이(*Sporothrix schenckii*), 스타필로코쿠스(Staphylococcus), 스타필로코쿠스 종, 스타필로코쿠스 종, 스트렙토코쿠스 아갈اكت이아에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트롱길로이데스 스테르코랄리스(*Strongyloides stercoralis*), 타에니아 솔리움(*Taenia solium*), 타에니아(*Taenia*) 종, 특소카라 카니스(*Toxocara canis*), 특소카라 카티(*Toxocara cati*), 특소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 트레포네마 팔리듐(*Treponema pallidum*), 트리키넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*), 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*), 트리코파이톤 멘타그로피테스(*Trichophyton mentagrophytes*), 트리코파이تون 루브룸(*Trichophyton rubrum*), 트리코파이تون 루브룸, 트리코파이تون 톤수란스(*Trichophyton tonsurans*), 트리코파이تون(*Trichophyton*) 종, 트리코스포론 베이겔리이(*Trichosporon beigelii*), 트리쿠리스 트리키우라(*Trichuris trichiura*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 우레아플라즈마 우레알리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*), 바리셀라 조스터(*Varicella zoster*) 바이러스(VZV), 바리올라메이저(*Variola major*), 바이올라 마이너(*Variola minor*), 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라해몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*), 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 우캐리아 반크로프티(*Wuchereria bancrofti*), 황열병 바이

러스, 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 예르시니아 슈도투베르콜로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*) 또는 지카(Zika) 바이러스.

[0281]

예시적인 항체 분자는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 3F8, 8H9, 아바고보맙, 압식시맙, 아비투주맙, 아브릴루맙, 악토주맙, 아달리무맙, 아데카투무맙, 아두카누맙, 아파세비쿠맙, 아펠리모맙, 아푸투주맙, 알라시주맙 폐골, ald518, 알렙투주맙, 알리로코맙, 알투모맙 웬테테이트, 아마툭시맙, 아나투모맙 마페나톡스, 아네투모맙 라브탄신, 아니프롤루맙, 안루킨주맙(ima-638), 아풀리주맙, 아르시투모맙, 아스크린바쿠맙, 아셀리주맙, 아테졸리주맙, 아티누맙, 아틀리주맙(토실리주맙), 아토롤리무맙, 아벨루맙, 바피네우주맙, 바실릭시맙, 바비툭시맙, 베투모맙, 베겔로맙, 벨리무맙, 벤랄리주맙, 베르틸리무맙, 베실레소맙, 베바시주맙, 베즐로톡수맙, 비시로맙, 비마그루맙, 비메키주맙, 비바투주맙 메르탄신, 블레셀루맙, 블리나투모맙, 블론투베트맙, 블로소주맙, 보코시주맙, 브라지쿠맙, 브렌툭시맙 베도틴, 브리아키누맙, 브로달루맙, 브롤루시주맙, 브론틱투주맙, 카비랄리주맙, 카나키누맙, 칸투주맙 메르탄신, 칸투주맙 라브탄신, 카플라시주맙, 카프로맙 웬테티드, 카를루맙 카로툭시맙, 카투막소맙, cb96-독소루비신 면역접합체, 세딜리주맙, 세르구투주맙 아n날류킨, 세르톨리주맙 폐골, 세툭시맙, ch.14.18, 시타투주맙 보가톡스, 식수투무맙, 클라자키주맙, 클레놀릭시맙, 클리바투주맙 테트락세탄, 코드리투주맙, 콜툭시맙 라브탄신, 코나투무맙, 콘시주맙, 크레네주맙, 크로테두맙, cr6261, 다세투주맙, 다클리주맙, 달로투주맙, 다피롤리주맙 폐골, 다라투무맙, 텍트레쿠맙, 템시주맙, 텐니투주맙 마포도틴, 테노수맙, 텔로툭시맙 비오틴, 테투모맙, 디누툭시맙, 디리다부맙, 도마그로주맙, 도를리모맙 아리톡스, 드로지투맙, 둘리고투맙, 두필루맙 두르빌루맙, 두시기투맙, 에크로멕시맙, 에콜리주맙, 에도바코맙, 에드레콜로맙, 에팔리주맙, 에푼구맙, 엘델루맙, 엘젬투맙, 엘로투주맙, 엘실리모맙, 에막투주맙, 에미베토주맙, 에미시주맙, 에나바투주맙, 엔포르투맙 베도틴, 엔리모맙 폐골, 에노블리투주맙, 에노키주맙, 에노티쿠맙, 엔시툭시맙, 에피투모맙 시툭세탄, 에프라투주맙, 에레누맙, 에를리주맙, 에르투막소맙, 에타라시주맙, 에트롤리주맙, 에비나쿠맙, 에볼로쿠맙, 엑스비비루맙, 파놀레소맙, 파랄리모맙, 파를레투주맙, 파시누맙, fbta05, 펠비주맙, 폐자키누맙, 피바투주맙, 피클라투주맙, 피기투무맙, 피리부맙, 플란보투맙, 플레티쿠맙, 폰톨리주맙, 포랄루맙, 포라비루맙, 프레솔리무맙, 폴라누맙, 푸툭시맙, 갈카네주맙, 갈릭시맙, 가니투맙, 간테네루맙, 가빌리모맙, 겹투주맙 오조가미신, 계보키주맙, 기렌툭시맙, 글램바투무맙 베도틴, 골리무맙, 고밀릭시맙, 구셀쿠맙, 이발리주맙, 이브리투모맙 티وخ세탄, 이크루쿠맙, 이다루시주맙, 이고보맙, imab362, 이말루맙, 임시로맙, 임가투주맙, 인클라쿠맙, 인다툭시맙 라브탄신, 인두사투맙 베도틴, 이네빌리주맙, 인플릭시맙, 인테투무맙, 이놀리모맙, 이노투주맙 오조가미신, 이필리무맙, 이라투무맙, 이사툭시맙, 이톨리주맙, 익세키주맙, 켈릭시맙, 라베토주맙, 랍브롤리주맙, 람팔리주맙, 라나넬루맙, 란도그로주맙, 라프리툭시맙 엠탄신, 레브리키주맙, 레말레소맙, 렌달리주맙, 렌질루맙, 레르델리무맙, 렉사투무맙, 리비비루맙, 리파스투주맙 베도틴, 리겔리주맙, 릴로토맙 사테트락세탄, 린투주맙, 리릴루맙, 로엘시주맙, 로키베트맙, 로르보투주맙 메르탄신, 루카투무맙, 룰리주맙 폐골, 루밀릭시맙, 룸레투주맙, 마파투무맙, 마르게툭시맙, 마슬리모맙, 마브릴리무맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 메텔리무맙, 밀라투주맙, 민레투모맙, 미르베톳시맙 소라브탄신, 미투모맙, 모가물리주맙, 모날리주맙, 모롤리무맙, 모타비주맙, 목세투모맙 파수도톡스, 무로모납-cd3, 나콜로맙 타페나톡스, 나밀루맙, 납투모맙 에스타페나톡스, 나라툭시맙 엠탄신, 나르나투맙, 나탈리주맙, 나비식시주맙, 나비부맙, 네바쿠맙, 네시투무맙, 네몰리주맙, 네렐리모맙, 네스바쿠맙, 니모투주맙, 니볼루맙, 노페투모맙 메르펜탄, 오빌록삭시맙, 오비누투주맙, 오카라투주맙, 오크렐리주맙, 오둘리모맙, 오파투무맙, 올라라투맙, 올로키주맙, 오말리주맙, 오나르투주맙, 온툭시주맙, 오피시누맙, 오포르투주맙 모나톡스, 오레고보맙, 오르티쿠맙, 오텔릭시주맙, 오트레르투주맙, 옥셀루맙, 오자네주맙, 오조랄리주맙, 파기박시맙, 팔리비주맙, 팜레블루맙, 파니투무맙, 판코맙, 파노바쿠맙, 파르사투주맙, 파스콜리주맙, 파소툭시주맙, 파테클리주맙, 파트리투맙, 펠브롤리주맙, 펠투모맙, 폐라키주맙, 폐르투주맙, 펙셀리주맙, 피딜리주맙, 피나투주맙 베도틴, 핀투모맙, 플라콜루맙, 플로잘리주맙, 포갈리주맙, 폴라투주맙 베도틴, 포네주맙, 프레잘리주맙, 프릴릭시맙, 프리록삭시맙, 프리투무맙, pro 140, 퀼리주맙, 라코투모맙, 라드레투맙, 라피비루맙, 랄파시주맙, 라무시루맙, 라니비주맙, 락시바쿠맙, 레파네주맙, 레가비루맙, 레슬리주맙, 릴로투무맙, 리누쿠맙, 리산키주맙, 리툭시맙, 리바바주맙 폐골, 로바투무맙, 롤레두맙, 로모소주맙, 론탈리주맙, 로발피투주맙 테시리네, 로밸리주맙, 루플리주맙, 사시투주맙 고비테칸, 사말리주맙, 사펠리주맙, 사릴루맙, 사투모맙 웬데티드, 세쿠키누맙, 세리반투맙, 세툭삭시맙, 세비루맙, 시브로투주맙, sgn-cd19a, sgn-cd33a, 시팔리무맙, 실툭시맙, 심투주맙, 시플리주맙, 시루쿠맙, 소피투주맙 베도틴, 솔라네주맙, 솔리토맙, 소네프시주맙, 손투주맙, 스타물루맙, 술레소맙, 수비주맙, 타발루맙, 타카투주맙 테트락세탄, 타도시주맙, 탈리주맙, 탐투베트맙, 타네주맙, 타풀리투모맙 팝톡스, 타렉스투맙, 태피바주맙, 텔리모맙 아리톡스, 테나투모맙, 테넬릭시맙, 테풀리주맙, 테프로투무맙, 테시돌루맙, 테톨로맙, 테제펠루맙, tgn1412, 티실리무맙(트레멜리무맙), 틸드라키주맙, 티가투주맙, 티몰루맙, 티소투맙 베도틴, tnx-650, 토실리주맙(아틀리주

맙), 토랄리주맙, 토사톡수맙, 토시투모맙, 토베투맙, 트랄로키누맙, 트라스투주맙, 트라스투주맙 엠탄신, trbs07, 트레갈리주맙, 트레멜리무맙, 트레보그루맙, 투코투주맙 셀모류킨, 투비루맙, 우블리톡시맙, 울로쿠플루맙, 우렐루맙, 우르톡사주맙, 우스테키누맙, 우토밀루맙, 바다스톡시맙 탈리린, 반도르투주맙 베도틴, 반티투맙, 바누시주맙, 바팔릭시맙, 바를릴루맙, 바텔리주맙, 베돌리주맙, 베팔리모맙, 베센쿠맙, 비실리주맙, 보바릴리주맙, 볼로식시맙, 보르세투주맙 마포도틴, 보투무맙, 센투주맙, 잘루투무맙, 자놀리무맙, 자툭시맙, 지랄리무맙, 졸리모맙 아리톡스, 또는 이들의 유도체.

[0282] 한 실시양태에서, 항체 분자는 CDR의 카바트 또는 코티아 정의를 사용하여, 본원에서 설명되는 항체 분자의 VH 영역의 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 CDR의 카바트 또는 코티아 정의를 사용하여, 본원에서 설명되는 항체 분자의 VL 영역의 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 CDR의 카바트 또는 코티아 정의를 사용하여, 본원에서 설명되는 항체 분자의 VH 영역의 하나 이상의(예를 들어, 2 또는 3개의) CDR 및/또는 VL 영역의 하나 이상의(예를 들어, 2 또는 3개의) CDR을 포함한다.

[0283] 한 실시양태에서, 항체 분자는 본원에서 설명되는 항체 분자의 VH 영역의 1, 2, 3 또는 4개의 프레임워크를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 본원에서 설명되는 항체 분자의 VL 영역의 1, 2, 3 또는 4개의 프레임워크를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 본원에서 설명되는 항체 분자의 VH 영역의 하나 이상의(예를 들어, 2, 3 또는 4개의) 프레임워크 및/또는 VL 영역의 하나 이상의(예를 들어, 2, 3 또는 4개의) 프레임워크를 포함한다.

[0284] 한 실시양태에서, 항체 분자는 본원에서 설명되는 항체 분자의 중쇄 가변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 본원에서 설명되는 항체 분자의 경쇄 가변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 중쇄 가변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 본원에서 설명되는 항체 분자의 경쇄 가변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0285] 한 실시양태에서, 항체 분자는 중쇄 불변 영역, 예를 들어 본원에서 설명되는 항체 분자의 중쇄 불변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 중쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 경쇄 불변 영역, 예를 들어 본원에서 설명되는 항체 분자의 경쇄 불변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 중쇄 불변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 중쇄 불변 영역, 및 경쇄 불변 영역, 또는 상기 영역에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열(예를 들어, 상기 영역에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나, 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열)을 갖는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 본원에서 설명되는 항체 분자의 중쇄 불변 영역, 경쇄 불변 영역, 및 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0286] 본원에서 설명되는 항체 분자는 원하는(예를 들어, 증가된) 반감기를 포함하고 이로 제한되지 않는 몇 가지의 유리한 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, 항체 분자는 본원에서 설명되는 장애를 효과적으로 치료, 예방 또는 진단하기 위해 사용될 수 있다.

[0287] 한 실시양태에서, 항체 분자는 표적 분자 또는 세포에 결합할 수 있다. 예를 들어, 조작된 항체 분자는 모 항체 분자와 비교하여 동일하거나 실질적으로 동일한 결합 특이성 및/또는 친화도로 표적 분자 또는 세포에 결합할 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 표적 분자 또는 세포에 높은 친화도로, 예를 들어 약 100 nM 미만, 일

반적으로 약 10 nM 미만, 보다 일반적으로는 약 10-0.01 nM, 약 5-0.01 nM, 약 3-0.05 nM, 예를 들어 약 1-0.1 nM, 또는 이보다 더 강한, 예를 들어 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 또는 0.01 nM 미만의 해리 상수(K_d)로 결합한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 표적 분자 또는 세포에 1×10^{-4} , 5×10^{-5} 또는 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 보다 느린 K_{off} 로 결합한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 표적 분자 또는 세포에 1×10^{-4} , 5×10^{-5} 또는 $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 보다 빠른 K_{on} 으로 결합한다.

[0288] 한 실시양태에서, 항체 분자는 표적 분자 또는 세포의 생물학적 기능을 억제하거나 활성화할 수 있다. 예를 들어, 조작된 항체 분자는 예를 들어 IC50, EC50 또는 LD50에 의해 결정된 바와 같이, 모 항체 분자와 비교하여 동일하거나 실질적으로 동일한 수준의 유효성으로 표적 분자 또는 세포의 생물학적 기능을 억제하거나 활성화할 수 있다.

[0289] 한 실시양태에서, 항체 분자는 표적 분자 또는 세포 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 조작된 항체 분자는 모 항체 분자와 비교하여 표적 분자 또는 세포 상의 동일하거나 실질적으로 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

예시적인 융합 단백질

[0291] 본원에서 설명되는 방법은 다양한 융합 단백질, 예를 들어 Fc 영역을 함유하는 임의의 Fc 융합 단백질을 조작하기 위해 사용될 수 있다.

[0292] 예시적인 Fc 융합 단백질은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: CTLA-4 Fc 융합 단백질(예를 들어, 벨라타셉트 또는 아바타셉트), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR) Fc 융합 단백질(예를 들어, VEGFR1/VEGFR2 Fc 융합 단백질, 예를 들어 아플리베르셉트 또는 KH902), IL-1R Fc 융합 단백질(예를 들어, 릴로나셉트), 트롬보포이에틴 결합 웨티드 Fc 융합 단백질(예를 들어, 로미플로스팀), LFA-3 Fc 융합 단백질(예를 들어, 알레파셉트), 항-CD40L Fc 융합 단백질(예를 들어, IgG1의 Fc 단편, 예를 들어 BMS-986004 또는 래톨리주맙에 연결된, CD40 리간드(CD40L 또는 CD154)를 표적으로 하는 항체(dAb)의 C-말단을 포함하는 이량체 융합 단백질), TNF 수용체(TNFR) Fc 융합 단백질(예를 들어, IgG1 Fc 도메인, 예를 들어 OPRX-106 또는 에타네르셉트에 융합된 재조합 TNF 수용체 2(TNFR2)), 응고 인자 VIII-Fc 융합 단백질(예를 들어, BIIB031, 에프랄록토코그-α, rFVIIIFc), 응고 인자 IX-Fc 융합 단백질(예를 들어, BIIB029, 에프트레노나코그-α), 인자 IX Fc 융합 단백질(예를 들어, rFIXFc), 과립구 콜로니 자극 인자 Fc 융합 단백질(예를 들어, F-627), 난포 자극 호르몬(FSH) Fc 융합 단백질(예를 들어, KN015), 액티빈 타입 2B 수용체 Fc 융합 단백질(예를 들어, STM 434), 액티빈 수용체 유사 키나제 1(ALK-1) 억제제 수용체 Fc 융합 단백질(예를 들어, 달란테르셉트), RNase Fc 융합체(예를 들어, RSLV-132), 항-안지오포이에틴 웨티바디(예를 들어, Fc 영역, 예를 들어 AMG 386에 융합된 안지오포이에틴 결합 특성을 갖는 웨티드), 조직 비특이적 알칼리성 포스파타제(TNSALP) Fc 융합 단백질(예를 들어, 아스포타제 알파 또는 ENB-0040), CD24 Fc 융합 단백질, BAFF-Fc 융합 단백질(예를 들어, 블리시비모드), GLP1 웨티드 유사체 Fc 융합 단백질(예를 들어, 둘라글루티드 또는 LY2189265), 에리트로포이에틴 모방 웨티드 Fc 융합 단백질(예를 들어, 에리트로포이에틴 모방 웨티드-IgG1 Fc 미메티바디(mimetic body)(예를 들어, CNTO 528), 또는 에리트로포이에틴 모방 웨티드-IgG4 Fc 융합 단백질 미메티바디(예를 들어, CNTO 530)), 또는 CD95 Fc 융합체(예를 들어, APG 101 또는 아포셉트).

동물 모델

[0294] 본원에서 설명되는 폴리웨티드(예, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 예를 들어 다양한 동물 모델을 사용하여 생체내에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 동물 모델은 표적 분자 또는 세포의 생물학적 기능을 조절하는데 있어서 본원에서 설명되는 폴리웨티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 효능을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 다른 예로서, 동물 모델은 또한 본원에서 설명되는 장애의 치료, 예방 또는 진단에 있어서 본원에서 설명되는 폴리웨티드(예를 들어, 항체 분자)의 효능을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 부작용을 조사하고, 계내에서 항체 분자의 농도를 측정하고, 표적 분자 또는 세포의 기능과 본원에서 설명되는 장애 사이의 상관관계를 입증하기 위해 동물 모델을 사용할 수도 있다.

[0295] 본원에서 설명되는 다른 장애에 대한 예시적인 동물 모델이 또한 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 본원에서 설명되는 항체 분자를 평가하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 동물의 유형은 마우스, 래트, 토끼, 기니 피그 및 원숭이를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 인간 FcRn을 발현하는 비인간 영장류 및 트랜스제닉 마우스는 전형적으로 PK 분석을 위한 선택 모델로서 사용된다(Avery et al. *MAbs*. 2016; 8(6):1064-78; Fan et al. *MAbs*.

2016; 8(5):848-53; Tam et al. Mabs. 2013; 5(3):397-405).

[0296] 예를 들어, 인간화 FcRn 유전자는 마우스 FcRn 유전자에 결실을 갖는 마우스 주의 생성, 이어서 인간 FcRn 유전자의 도입을 포함하는 순차적인 방식으로 C57BL/6J 배경에 확립될 수 있다. 예시적인 마우스 주는 예를 들어 Tg276 및 Tg32(The Jackson Laboratory 재고 번호 004919 및 014565)를 포함한다. 추가의 역교배 및 순차적 변경을 통해, 추가의 동물주를 만들 수 있다. 본원에서 설명되는 폴리펩티드를 평가하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 마우스 모델은 예를 들어 문헌 [Proetzel et al. BioDrugs. 2014; 28(2): 171-180]에 기재된 바와 같이 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: FcRn-결핍(null) 마우스, 인간화 Tg276 FcRn 마우스(예를 들어, B6.Cg-Fcg_{rt}<t_m1Dcr>Tg(CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ, Jackson Laboratory 재고 번호 011965), 인간화 Tg32 FcRn 마우스(예를 들어, B6.Cg-Fcg_{rt}<t_m1Dcr>Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ, Jackson Laboratory 재고 번호 014565), 면역 결핍 hFcRn 마우스(B6.Cg-Fcg_{rt}<t_m1Dcr>Prkdc<scid>Tg(CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ, Jackson Laboratory 재고 번호 021146, B6.Cg-Fcg_{rt}<t_m1Dcr>Prkdc<scid>Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ, Jackson Laboratory 재고 번호 018441, 및 B6.Cg-Rag1<t_m>Mom<Fcgr>t_m1Dcr[Tg(CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ, Jackson Laboratory 재고 번호 16919).

약학 조성물 및 키트

[0298] 일부 측면에서, 본 개시내용은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 제제화된, 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 포함하는 조성물, 예를 들어 약학적으로 허용되는 조성물을 제공한다.

[0299] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 상용성인 임의의 및 모든 용매, 분산매, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 담체는 정맥 내, 근육내, 피하, 비경구, 직장, 척추 또는 표피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입에 의한)에 적합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물 내의 약 5% 미만, 예를 들어 약 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 항체 분자는 응집체로서 존재한다. 다른 실시양태에서, 약학 조성물 내의 적어도 약 95%, 예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 98.5%, 99%, 99.5%, 99.8% 또는 그 초과의 항체 분자는 단량체로서 존재한다. 일부 실시양태에서, 응집체 또는 단량체의 수준은 크로마토그래피, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피 크기 배제 크로마토그래피(HPLC-SEC)에 의해 결정된다.

[0300] 본원에서 제시되는 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이들은 예를 들어 액상, 반고상 및 고상 투여 형태, 예컨대 액체 용액(예를 들어, 주사 및 주입 용액), 분산액 또는 혼탁액, 리포솜, 및 쥐약을 포함한다. 적합한 형태는 의도하는 투여 방식 및 치료 용도에 따라 결정된다. 전형적인 적합한 조성물은 주사 또는 주입 용액의 형태이다. 한 가지 적합한 투여 형태는 비경구(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내, 근육 내)이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 정맥 내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)은 근육 내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.

[0301] 본원에서 사용되는 문구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여되는"은 대체로 주사에 의한, 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 비제한적으로, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 경막 내, 관절낭 내, 안와 내, 심장 내, 피부 내, 복강 내, 경기관, 피하, 표피하, 관절 내, 피막하, 지주막하, 척추 내, 경막 외 및 흉골 내 주사 및 주입을 포함한다.

[0302] 치료 조성물은 전형적으로 멸균되고 제조 및 보관 조건 하에서 안정하여야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 분산액, 리포솜 또는 고농도 항체에 적합한 다른 규칙적인 구조로서 제제화될 수 있다. 멸균 주사 용액은 적합한 용매 내의 필요량의 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 일부)을 상기에 열거된 성분 중 한 가지 또는 이들 성분의 조합물에 혼입하고, 필요한 경우, 이어서 멸균 여과하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산매 및 상기에 열거된 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 비히클에 혼입하여 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 사전에 멸균 여과된 그의 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가의 바람직한 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조이다. 용액의 적합한 유동성은 예를 들어 레시틴판 같은 코팅제의 사용, 분산액일 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사 가능한 조성물은 조성물 내에 흡수를 지연하는 작용제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 흡수를 연장시킬 수 있다.

[0303] 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 여러 방법이 관련 기술 분야에 공지되어 있으며, 많은 치료, 예방 또는 진단 용도의 경우, 적합한 투여 경로/방식은 정맥 내 주사 또는 주입이다. 예를 들어, 항체 분자는 약 1 내지 100 mg/m², 바람직하게는 약 5 내지 50 mg/m², 약 7 내지 25 mg/m², 보다 바람직하게는, 약 10 mg/m²의 용량에 도달하도록 10 mg/min 미만, 바람직하게

는 5 mg/min 이하의 속도로 정맥 내 주입에 의해 투여될 수 있다. 통상의 기술자에게 인식되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 요구되는 결과에 따라 달라질 것이다. 특정 실시양태에서, 활성 화합물은 임플란트, 경피 패치, 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제제와 같은, 신속한 방출로부터 화합물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드(polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 상기 제제의 많은 제조 방법은 특히받았거나, 일반적으로 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0304] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 예를 들어 불활성 희석제 또는 동화 가능 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 항체 분자(및 요구되는 경우 다른 성분)는 또한 경질 또는 연질 외피 젤라틴 캡슐에 봉입되거나, 정제로 압축되거나, 대상체의 식이에 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료 투여의 경우, 항체 분자는 부형제와 함께 혼입되어, 섭취 가능한 정제, 구강정(buccal tablet), 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 혼탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여 이외의 방법에 의해 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)를 투여하기 위해서, 화합물을 그의 불활성화를 방지하는 물질로 코팅하거나, 화합물을 상기 물질과 함께 투여하는 것이 필요할 수 있다. 치료, 예방 또는 진단 조성물은 또한 의료 장치에 의해 투여될 수 있으며, 몇몇은 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0305] 투여 요법은 원하는 반응(예를 들어, 치료, 예방 또는 진단 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스가 투여될 수 있고, 여러 개의 분할된 용량이 일정 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나, 용량은 치료 상황의 긴급 정도에 의해 표시되는 바와 같이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여의 균일성을 위해 비경구 조성물을 단위 투여 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 단위 투여 형태는 치료되는 대상체에 대한 단일 투여로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하고; 각각의 단위는 요구되는 약학 담체와 함께 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 함유한다. 단위 투여 형태에 대한 상세한 내용은 (a) 항체 분자의 고유한 특성, 및 달성될 특정 치료, 예방 또는 진단 효과, 및 (b) 개체의 민감성을 다루기 위해 상기 항체 분자를 배합하는 기술에 내재하는 제한에 의해 좌우되고, 그에 직접적으로 의존한다.

[0306] 항체 분자의 치료, 예방 또는 진단을 위한 유효량의 예시적이고 비제한적인 범위는 약 0.1-50 mg/kg, 예를 들어 0.1-30 mg/kg, 예를 들어 약 1-30, 1-15, 1-10, 1-5, 5-10, 또는 1-3 mg/kg, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 mg/kg이다. 항체 분자는 약 1 내지 100 mg/m², 예를 들어 약 5 내지 50 mg/m², 약 7 내지 25 mg/m², 예를 들어 약 10 mg/m²의 용량에 도달하도록 10 mg/min 미만, 예를 들어 5 mg/min 이하의 속도로 정맥 내 주입에 의해 투여될 수 있다. 투여량 값은 완화될 병태의 유형 및 증증도에 따라 다를 수 있음에 유의해야 한다. 임의의 특정 대상체에 대해, 특정 투여 요법은 개체의 요구 및 조성물을 투여하거나 투여를 관리하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간에 걸쳐 조정되어야 하고, 본원에 제시된 투여량 범위는 단지 예시적이며 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하고자 하는 것이 아님을 또한 이해하여야 한다.

[0307] 본원에서 약학 조성물은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)의 "치료 유효량", "예방 유효량" 또는 "진단 유효량"을 포함할 수 있다.

[0308] "치료 유효량"은 요구되는 치료 결과를 달성하는데 필요한 투여에서 및 필요한 기간 동안 효과적인 양을 나타낸다. 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 나이, 성별, 및 체중, 및 항체 또는 항체 일부가 개체에서 바라는 반응을 유발하는 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료 유효량은 항체 분자의 임의의 독성 또는 해로운 영향보다 치료상 유익한 효과가 더 큰 양이다. "치료 유효 투여량"은 측정 가능한 파라미터를 치료받지 않은 대상체에 비해 전형적으로 적어도 약 20%, 예를 들어 적어도 약 40%, 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 80% 억제한다. 측정 가능한 파라미터는 예를 들어 혈뇨, 진한 색깔의 소변, 거품이 있는 소변, 통증, 수족 부기(부종) 또는 고혈압일 수 있다. 항체 분자가 측정 가능한 파라미터를 억제하는 능력은 본원에서 설명되는 장애를 치료 또는 예방하는 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 별법으로, 조성물의 상기 특성은 예를 들어 협판 내 검정에 의해, 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)가 표적 분자 또는 세포의 생물학적 기능을 조절하는 능력을검사함으로써 평가될 수 있다.

[0309] "예방 유효량"은 필요한 예방 결과를 달성하기 위해 필요한 투여에서 및 필요한 기간 동안 효과적인 양을 나타낸다. 전형적으로, 예방 용량은 질환 발생 전에 또는 질환의 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방

유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다.

[0310] "진단 유효량"은 필요한 진단 결과를 달성하기 위해 필요한 투여에서 및 필요한 기간 동안 효과적인 양을 나타낸다. 전형적으로, 진단 유효량은 장애, 예를 들어 본원에서 설명되는 장애가 시험관내에서, 생체외에서 또는 생체내에서 진단될 수 있는 양이다.

[0311] 또한, 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 포함하는 키트가 본 개시내용에서 제시된다. 키트는 다음을 포함하는 하나 이상의 다른 요소를 포함할 수 있다: 사용 설명서; 다른 시약, 예를 들어 표지, 치료제, 또는 항체 분자를 표지 또는 치료제, 또는 방사선 보호 조성물에 퀼레이팅하거나 또는 다른 방법으로 커플링하기 위해 유용한 작용제; 투여를 위한 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 제조하기 위한 장치 또는 다른 물질; 약학적으로 허용되는 담체; 및 대상체에게 투여하기 위한 장치 또는 다른 물질.

핵산

[0312] 본 개시내용은 또한 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질), 예를 들어, 본원에서 설명되는 폴리펩티드의 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 특징으로 한다.

[0313] 예를 들어, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 Fc 영역, 예를 들어, 본원에서 설명되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 코딩하는 핵산을 특징으로 한다. Fc 영역은 본원에서 설명되는 존재하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 Fc 영역으로부터 조작될 수 있다. 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 Fc 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이 서열에 대해 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 포함할 수 있다.

[0314] 한 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이 서열에 대해 실질적으로 상동성인 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이 서열에 대해 실질적으로 상동성인 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이 서열에 대해 실질적으로 상동성인 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함한다.

[0315] 한 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 중쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 CDR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이 서열에 대해 실질적으로 상동성인 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 경쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 CDR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이 서열에 대해 실질적으로 상동성인 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이 서열에 대해 실질적으로 상동성인 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 추가로 포함한다.

[0316] 한 실시양태에서, 핵산은 본원에서 설명되는 뉴클레오티드 서열의 일부를 포함한다. 상기 일부는 예를 들어, Fc 영역, 가변 영역(예를 들어, VH 또는 VL); 1, 2 또는 3개 또는 그 초과(예를 들어, 4, 5 또는 6개)의 CDR; 또는 1, 2, 3 또는 4개 또는 그 초과의 프레임워크 영역을 코딩할 수 있다.

[0317] 본원에서 개시되는 핵산은 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 그의 유사체를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥이거나 이중 가닥일 수 있으며, 단일 가닥인 경우에 코딩 가닥 또는 비코딩(안티센스)

가닥일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비뉴클레오티드 성분에 의해 차단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예를 들어 표지 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 핵산은 재조합 폴리뉴클레오티드, 또는 자연에서 발생하지 않거나 또 다른 폴리뉴클레오티드에 비자연적인 배열로 연결된 게놈, cDNA, 반합성, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

- [0319] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 핵산을 함유하는 숙주 세포 및 백터를 특징으로 한다. 핵산은 아래에서 보다 상세히 설명되는 바와 같이, 단일 백터 또는 동일한 숙주 세포 또는 별개의 숙주 세포에 존재하는 별개의 백터 내에 존재할 수 있다.

백터

- [0321] 본 개시내용은 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질), 예를 들어, 본원에서 설명되는 폴리펩티드의 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백터를 특징으로 한다.

- [0322] 예를 들어, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 본원에서 설명되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 백터를 특징으로 한다. Fc 영역은 본원에서 설명되는 존재하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 Fc 영역으로부터 조작될 수 있다. 상기 백터는 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)의 Fc 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 이 서열에 대해 실질적으로 상동성인 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열)을 포함할 수 있다.

- [0323] 백터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, 람다 파지 또는 효모 인공 염색체(YAC)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

- [0324] 많은 백터 시스템이 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 클래스의 백터는 예를 들어 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 바콜로바이러스, 레트로바이러스(라우스(Rous) 육종 바이러스, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 이용한다. 또 다른 클래스의 백터는 쎈리키 삼림열 바이러스(Semliki Forest virus), 동부형 말 뇌염 바이러스(Estern Equine Encephalitis virus) 및 플라비바이러스와 같은 RNA 바이러스로부터 유래된 RNA 요소를 이용한다.

- [0325] 추가로, DNA가 자신의 염색체 내에 안정적으로 통합된 세포는 형질감염된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 마커는 예를 들어, 영양요구성(auxotrophic) 숙주에 대한 원형 양성(prototropy), 살생물체 내성(예를 들어, 항생제), 또는 구리와 같은 중금속에 대한 내성 등을 제공할 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 발현되는 DNA 서열에 직접 연결되거나 또는 동시 형질전환에 의해 동일한 세포에 도입될 수 있다. 또한, mRNA를 최적으로 합성하기 위해 추가의 요소가 요구될 수 있다. 이를 요소는 스플라이스 신호뿐 아니라, 전사 프로모터, 인핸서, 및 종결 신호를 포함할 수 있다.

- [0326] 구축물을 포함하는 발현 백터 또는 DNA 서열이 발현을 위해 제조된 후에는, 발현 백터는 적합한 숙주 세포로 형질감염되거나 도입될 수 있다. 이를 달성하기 위해, 예를 들어, 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 전기천공, 레트로바이러스 형질도입, 바이러스 형질감염, 유전자 총, 지질 기반 형질감염 또는 다른 통상적인 기술과 같은 다양한 기술이 이용될 수 있다. 원형질체 융합의 경우, 세포는 배지에서 배양된 후, 적합한 활성에 대해 스크리닝 된다.

- [0327] 생성된 형질감염된 세포를 배양하고 생산된 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)를 회수하기 위한 방법 및 조건은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 기재내용을 기초로 하여 사용되는 구체적인 발현 백터 및 포유동물 숙주 세포에 따라 달라지거나 최적화될 수 있다.

세포

- [0329] 본 개시내용은 또한 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 본원에서 설명되는 방법에 따라 조작될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 본원에서 설명되는 항체 분자 또는 융합 단백질)의 뉴클레오티드 서열, 이 서열에 대해 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 상기 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하고/하거나 본원에서 설명되는 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열) 또는 상기 핵산 중의 하나의 일부를 갖는 핵산 분자를 포함할 수 있

다.

[0330] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 코딩하는 핵산을 포함하도록 유전적으로 조작된다.

[0331] 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 발현 카세트를 사용하여 유전적으로 조작된다. 문구 "발현 카세트"는 뉴클레오티드 서열과 상용성인 숙주에서 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 상기 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 카세트는 프로모터, 인트론이 있거나 없는 오픈 리딩 프레임, 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 예를 들어 유도 가능 프로모터와 같이 발현 수행에 필요하거나 도움이 되는 추가의 인자가 또한 사용될 수 있다.

[0332] 본 개시내용은 또한 본원에서 설명되는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0333] 세포는 진핵 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 또는 인간 세포일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 적합한 진핵 세포는 Vero 세포, HeLa 세포, COS 세포, CHO 세포, HEK293 세포, BHK 세포 및 MDCKII 세포를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 적합한 곤충 세포는 Sf9 세포를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

폴리펩티드의 용도

[0335] 본원에서 개시되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)뿐만 아니라 본원에서 개시되는 약학 조성물은 시험관내에서, 생체외에서 및 생체내에서의 치료, 예방 및/또는 진단적 유용성을 갖는다.

[0336] 한 실시양태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 표적 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포의 하나 이상의 생물학적 활성을 조절(예를 들어, 감소(예를 들어, 억제, 차단 또는 중화)시키거나 증가(예를 들어, 활성화, 개시 또는 강화)한다. 예를 들어, 이를 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 표적 분자 또는 세포의 하나 이상의 생물학적 활성을 조절하기 위해 배양액 내의 세포에, 시험관내에서 또는 생체외에서, 또는 대상체, 예를 들어 인간 대상체에게, 예를 들어 생체내에서 투여될 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 장애, 예를 들어 본원에서 설명되는 장애가 치료, 예방 또는 진단되도록 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 상기 장애를 치료, 예방 또는 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 장애, 예를 들어 표적 분자 또는 세포와 관련된 장애(예를 들어, 본원에서 설명되는 장애)를 치료, 예방 또는 진단하기 위해 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 배양액 내의 세포와, 예를 들어 시험관내에서 또는 생체외에서 접촉시키거나, 또는 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 대상체에게, 예를 들어 생체내에서 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0337] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체, 예를 들어 본원에서 설명되는 장애를 갖거나 또는 본원에서 설명되는 장애가 발생할 위험이 있는 인간 환자이다. "비인간 동물"이란 용어는 포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 본원에서 설명되는 방법 및 조성물은 본원에서 설명되는 장애에 대해 인간 환자를 치료하기에 적합하다. 본원에서 설명되는 장애를 갖는 환자는 본원에서 설명되는 장애가 발생하였지만 (적어도 일시적으로) 무증상인 환자, 본원에서 설명되는 장애의 증상을 보인 환자, 또는 본원에서 설명되는 장애와 관련된 장애를 갖는 환자를 포함한다.

장애를 치료하거나 예방하는 방법

[0339] 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 장애 또는 병태를 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 장애 또는 병태를 치료 또는 예방하기에 바람직 할 수 있는 최적 또는 개선된 반감기를 갖는다. 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, 한 실시양태에서, 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 최적 또는 개선된 반감기를 갖는 폴리펩티드)는 동일하거나 유사한 결합 친화도 및/또는 특이성을 갖는 다른 폴리펩티드(예를 들어, 최적 또는 개선된 반감기를 갖지 않거나 갖도록 조작되지 않은 폴리펩티드)에 비해 하나 이상의 이점을 제공할 수 있다고 생각된다. 이러한 이점은 치료 또는 예방 효능의 증가, 투여 요법의 감소, 또는 약동학적 특성의 개선을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 본원에서 설명되는 돌연변이된 Fc 영역을 포함한다.

[0340] 본원에서 설명되는 폴리펩티드에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 예시적인 장애 또는 병태는 암(예를 들어, 고형 종양 또는 혈액암), 감염성 질환(예를 들어, 박테리아 감염 또는 바이러스 감염), 면역 장애(예를 들어, 자가면역 장애), 염증성 장애, 대사 장애(예를 들어, 당뇨병), 심혈관 질환, 장기 이식 거부를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 장애는 만성 장애이다.

[0341]

본원에서 설명되는 폴리펩티드에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 예시적인 암은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 급성 림프모구성 백혈병(ALL: acute lymphoblastic leukemia), 급성 골수성 백혈병(AML: acute myeloid leukemia), 부신피질 암종, 카포시(Kaposi) 육종, AIDS-관련 림프종, 원발성 중추 신경계(CNS: central nervous system) 림프종, 항문암, 맹장암, 성상세포종, 비정형 유기형/간상 종양, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골암(예를 들어, 유잉(Ewing) 육종 또는 골육종 및 악성 섬유성 조직구증), 뇌종양(예를 들어, 성상세포종, 뇌간신경교종, 중추 신경계 비정형 유기형/간상 종양, 중추 신경계 배아성 종양, 중추 신경계 생식세포 종양, 두개인두종, 또는 상의세포종), 유방암, 기관지 종양, 버킷(Burkitt) 림프종, 카르시노이드 종양(예를 들어, 위장관 카르시노이드 종양), 심장 종양, 배아성 종양, 생식세포 종양, 림프종, 자궁경부암, 담관암종, 척삭종, 만성 림프구성 백혈병(CL: chromic lymphocytic leukemia), 만성 골수성 백혈병(CML: chronic myelogenous leukemia), 만성 골수 증식성 신생물, 결장암, 결장직장암, 두개인두종, 피부 T 세포 림프종, 관상피내 암종(DCIS: ductal carcinoma in situ), 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 감각 신경모세포종, 유잉 육종, 두개 외 생식세포 종양, 고환 외 생식세포 종양, 안암(예를 들어, 안구 내 흑색종 또는 망막모세포종), 나팔관암, 뼈의 섬유성 조직구증, 골육종, 담낭암, 위암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 간질 종양(GIST: gastrointestinal stromal tumor), 생식세포 종양(예를 들어, 중추 신경계 종양, 두개 외 종양, 고환 외 종양, 난소암, 또는 고환암), 임신 영양막 질환, 신경교종, 모양 세포 백혈병, 두경부암, 간세포(간) 암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구 내 흑색종, 섬세포 종양, 췌장 신경 내분비 종양, 카포시 육종, 신장암(예를 들어, 신세포암 또는 윌름스(Wilms) 종양), 랑게르ハン스 세포 조직구증(LCH: Langerhans cell histiocytosis), 후두암, 백혈병(예를 들어, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 또는 모양 세포 백혈병), 구순/구강암, 간암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암(NSCLC: non-small cell lung cancer) 또는 소세포 폐암), 림프종(예를 들어, AIDS 관련, 버킷 림프종, 피부 T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 또는 원발성 중추 신경계(CNS) 림프종), 발덴스트룀(Waldenstroem) 거대글로불린혈증, 남성 유방암, 뼈의 악성 섬유성 조직구증 및 골육종, 흑색종(예를 들어, 안구 내 (눈) 흑색종), 메르켈(Merkel) 세포 암종, 중피종, 전이성 편평 경부암, 중심선 판(midline tract) 암종, 구강암(mouth cancer), 다발성 내분비 신생물 증후군, 다발성 골수종/형질세포 신생물, 균상식육종, 골수형성 이상 증후군, 골수형성 이상/골수 증식성 신생물, 만성 골수 증식성 신생물, 비강 및 부비동 암, 비인두암, 신경모세포종, 구강암, 구순/구강암, 구강인두암, 골육종 및 뼈의 악성 섬유성 조직구증, 난소암(예를 들어, 상피 난소암 또는 생식세포 난소 종양), 췌장암, 췌장 신경내분비 종양(섬세포 종양), 유두종증, 부신경절종, 부비동/비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 갈색세포종, 뇌하수체 종양, 흉막폐 모세포종, 복막암, 전립선암, 직장암, 망막모세포종, 횡문근육종, 침샘암, 육종(예를 들어, 유잉 육종, 카포시 육종, 골육종, 횡문근육종, 연조직 육종, 또는 자궁 육종), 세자리(Sezary) 증후군, 피부암(예를 들어, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 또는 비흑색종 피부암), 소장암, 편평세포 암종, 정소암, 인후암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 신우 및 요관의 이행세포 암, 요도암, 자궁내막암, 질암, 외음부암, 또는 이들의 전이성 병변.

[0342]

본원에서 설명되는 폴리펩티드에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 예시적인 감염성 질환은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 아시네토팍터(Acinetobacter) 감염, 방선균증, 아프리카 수면병(아프리카 과동편모충증), AIDS(후천성 면역 결핍 증후군: Acquired immunodeficiency syndrome), 아메바증, 아나플라즈마감염증, 광동주 혈선충증, 고래회충증, 탄저병, 아르카노박테리움 헤몰리티쿰(Arcanobacterium haemolyticum) 감염, 아르헨티나 출혈열, 회충증, 아스페르길루스증, 아스트로바이러스 감염, 바베시아증, 바실루스 세레우스 감염, 박테리아성 폐렴, 박테리아성 질염, 박테리오데스(Bacteroides) 감염, 대장섬모충증, 바르토넬라증, 바일리사스카리스(Baylisascaris) 감염, BK 바이러스 감염, 흑색 사모증, 블라스토시스증(blastocystosis), 분아균증(blastomycosis), 볼리비아 출혈열, 보톨리눔 독소증(및 영어 보톨리눔 독소증), 브라질 출혈열, 브루셀라병, 선 폐스트, 부르크홀데리아 감염, 부룰리 케양, 카이시바이러스(Caicivirus) 감염(노로바이러스 및 사포바이러스), 캄피로박테리아증, 칸디다증(모닐리아증; 아구창), 캐필라리아증, 카리온(carrion) 병, 고양이 할瘵병, 봉와직염, 샤가스병(미국 트리파노소마증), 무른 케양, 수두, 치쿤구니야, 클라미디아, 클라미도필라 뉴모니아에(Chlamydophila pneumoniae) 감염(대만 급성 호흡기 감염물 또는 TWAR: Taiwan acute respiratory agent), 콜레라, 클로모블라스트진균증, 키트리디오진균증, 간흡충증, 클로스트리디움 디피실레(Clostridium difficile) 대장염, 콕시디오이데스진균증, 콜로라도 진드기 열(CTF: Colorado tick fever), 통상적인 감기(급성 바이러스성 비인두염; 급성 코감기), 크로이츠펠트-야콥병(CJD: Creutzfeldt-Jakob disease), 크림-콩고 출혈열(CCHF: Crimean-Congo hemorrhagic fever), 크립토콕쿠스증, 크립토스포리디오시스증, 피부 유충 이행증(CLM: Cutaneous larva migrans), 원포자충증, 낭미충증, 사이토메갈로바이러스 감염, 뎅기열, 데스모데스무스(Desmodesmus) 감염, 이핵아메바증, 디프테리아, 열두조충증, 메디나충증, 에볼라 출혈열, 포충증, 엘리히증,

요충증(요충 감염), 장내구균 감염, 엔테로바이러스 감염, 발진 티푸스, 전염성 홍반(제5병), 돌발진(제6병), 간질증, 비대흡충증, 치명적 가족성 불면증(FFI: Fatal familial insomnia), 펠라리아병, 클로스트리디움 퍼프린겐스(*Clostridium perfringens*)에 의한 식중독, 자유생활형 아메바 감염, 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 감염, 가스 괴저(클로스티리디움성 근괴저), 지오토리쿰증, 게르스트만-슈트로이슬러-샤인커 증후군(GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome), 편모충증, 마비저, 악구충증, 임질, 서혜부 육아종(도노반증), A군 스트렙토코쿠스 감염, B군 스트렙토코쿠스 감염, 혜모필루스 인플루엔자에 감염, 수족구병(HFMD: Hand, foot, and mouth disease), 한타바이러스 폐 증후군(HPS: Hantavirus Pulmonary Syndrome), 하트랜드 바이러스 질환, 헬리코박터 파일로리 감염, 용혈성 요독성 증후군(HUS: Hemolytic-uremic syndrome), 신증후군을 동반한 출혈열(HFRS: Hemorrhagic fever with renal syndrome), A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염, 헤르페스 심플렉스, 히스토플라스마증, 구충 감염, 인간 보카바이러스 감염, 인간 유잉기이 엘리히증, 인간 파립구성 아나플라즈마감염증(HGA: Human granulocytic anaplasmosis), 인간 메타뉴모바이러스 감염, 인간 단핵구성 엘리히증, 인간 유두종바이러스(HPV: Human papillomavirus) 감염, 인간 파라인플루엔자 바이러스 감염, 왜소조충증, 엡스타인-바 바이러스 감염성 단핵구증(모노), 인플루엔자(플루), 이소스포라증, 가와사키병, 각막염, 킹겔라 킹가에(Kingella kingae) 감염, 쿠루, 라싸 열, 레지오넬라증(재향군인병), 레지오넬라증(폰티악 열병), 리슈마니아증, 한센병, 렙토스파리증, 리스테리아증, 라임병(라임 보렐리아증), 림프 사상충증(상피병), 림프구성 맥락 뇌막염, 말라리아, 마모그 출혈열(MHF: Marburg hemorrhagic fever), 홍역, 중동 호흡기 증후군(MERS: Middle East respiratory syndrome), 멜리오아이도시스(휘트모어(Whitmore) 병), 수막염, 수막구균성 질환, 요코가와흡충증, 미포자충증, 전염성 연속종(MC: Molluscum contagiosum), 원두증, 유행성 이하선염, 뮤린 발진티푸스(풍토성 발진티푸스), 마이코플라스마(*Mycoplasma*) 폐렴, 진균증(범주 모호성 해소), 구데기증, 신생아 결막염(신생아 안염), (새로운) 변종 크로이츠펠트-야콥병(vCJD: Variant Creutzfeldt-Jakob disease, nvCJD), 노카르디아증, 온코세르카증(사상충증), 오피스토르키스감염증, 파라콕시디오이데스진균증(남아메리카 분아균증), 폐흡충증, 파스투렐라병, 머릿니 기생증(머릿니), 이 기생증(몸이), 사면발이 기생증(사면발이), 골반 염증성 질환(PID: Pelvic inflammatory disease), 폐르투시스(백일해), 폐스트, 폐렴구균 감염, 뉴머시스티스성 폐렴(PCP: *Pneumocystis pneumonia*), 폐렴, 소아마비, 프레보텔라(*Prevotella*) 감염, 원발성 아메바 수막뇌염(PAM: Primary amoebic meningoencephalitis), 진행성 다초점 백색질 뇌증, 앵무새병, Q 열, 광견병, 회귀열, 호흡기 세포 응합 바이러스 감염, 비육아종, 리노바이러스 감염, 리케차 감염, 리케차두창, 리프트 계곡 열(RVF), 로키산 홍반열(RMSF: Rocky Mountain spotted fever), 로타바이러스 감염, 풍진, 살모넬라증, SARS(중증 급성 호흡기 증후군: Severe Acute Respiratory Syndrome), 옴, 주혈흡충증, 폐혈증, 시겔라증(세균성이질), 대상 포진(헤르페스 조스터), 천연두(두창), 스포로트리콤증, 스타필로코쿠스성 식중독, 스타필로코쿠스 감염, 간충증, 아급성 경화성 범뇌염, 매독, 조충증, 파상풍(개구장애), 백선성 모창(이발소양진), 두부 백선(머리 백선증), 몸 백선증(체부 백선), 살백선(완선), 손 백선(손 백선증), 흑색 백선증, 발 백선증(무좀), 조갑백선(손발톱진균증), 어루러기(전풍), 특소카라증(안구 유충 이행증(OLM: Ocular Larva Migrans)), 특소카라증(내장 유충 이행증(VLM: Visceral Larva Migrans)), 트라코마, 특소플라스마증, 선모충증, 트리코모나스증, 편충증(편충 감염), 투베르콜로시스, 야토병, 장티푸스, 발진티푸스, 우레아플라즈마 우레알리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*) 감염, 계곡 열, 베네주엘라 말 뇌염, 베네주엘라 출혈열, 비브리오 불니피쿠스 감염, 비브리오 파라해몰리티쿠스 장염, 바이러스성 폐렴, 웨스트 나일 열병, 백색사모(백색 윤선), 예르시니아 슈도투베르콜로시스 감염, 예르시니아증, 황열, 지카열, 또는 접합균증.

[0343]

본원에서 설명되는 폴리펩티드에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 예시적인 면역 장애 또는 병태는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 애디슨(Addison) 병, 무감마글로불린혈증, 원형탈모증, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 항-GBM/항-TBM 신장염, 항인지질증후군(APS: antiphospholipid syndrome), 자가면역 간염, 자가면역 내이병(AIED:autoimmune inner ear disease), 축삭 및 뉴런성 신경병증(AMAN: axonal & neuronal neuropathy), 베체트(Behcet) 병, 수포성 천포창, 캐슬만병(CD: Castleman disease), 셀리악(Celiac) 병, 샤가스(Chagas) 병, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(CIDP: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 만성 재발성 다발성 골수염(CRMO: chronic recurrent multifocal osteomyelitis), 척-스트라우스(Churg-Strauss), 반흔성 유천포창/양성 점막 유천포창, 코간(Cogan) 증후군, 한랭 응집소 질환, 선천성 심장 차단, 콕삭기(Coxsackie) 심근염, CREST 증후군, 크론(Crohn) 병, 포진성 피부염, 피부근육염, 데빅(Devic) 병(시신경척수염), 원판상 루푸스, 드레슬러(Dressler) 증후군, 자궁내막증, 호산성 식도염(EoE), 호산성 근막염, 결절성 홍반, 본태성 혼합 한랭 글로불린혈증, 에반스(Evans) 증후군, 섬유근육통, 섬유성 폐포염, 거대세포 동맥염(측두동맥염), 거대세포 심근염, 사구체신염, 굿페스쳐(Goodpasture) 증후군, 다발성 맥관염 동반 육아종증, 그레이브스(Graves) 병, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 하시모토(Hashimoto) 갑상선염, 용혈성 빈혈, 혜노호-숀

라인(Henoch-Schonlein) 자반증(HSP), 임신성 포진 또는 임신 유사천포창(PG: pemphigoid gestationis), 저감 마글로불린혈증, IgA 신경병증, IgG4-연관 경화성 질환, 봉입체 근육염(IBM: Inclusion body myositis), 간질 성 방광염(IC: Interstitial cystitis), 소아 관절염, 소아 당뇨병(1형 당뇨병), 소아 근염(JM: juvenile myositis), 카와사키(Kawasaki) 증후군, 램버트-이튼(Lambert-Eaton) 증후군, 백혈구파괴 혈관염, 편평태선, 경화태선, 목질결막염, 선상 IgA 질환(LAD: Linear IgA disease), 루푸스, 만성 라임(Lyme) 병, 메니에르(Meniere) 병, 현미경적 다발혈관염, 혼합성 결합 조직 질환(MCTD: mixed connective tissue disease), 무렌(Mooren) 궤양, 무카-하베르만(Mucha-Habermann) 병, 다발성 경화증(MS: multiple sclerosis), 중증 근무력증, 근염, 기면증, 시신경척수염, 호중구감소증, 안 반흔성 유천포창, 시신경염, 재발성 류마티즘(PR: palindromic rheumatism), PANDAS(스트렙토코쿠스 연관 소아기 자가면역성 신경정신과적 장애(Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcus)), 부신생물성 소뇌 변성(PCD: paraneoplastic cerebellar degeneration), 발작성 야간 색소뇨증(PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), 패리 롬버그(Parry Romberg) 증후군, 평면부염(주변부 포도막염), 파스너지-터너(Parsonnage-Turner) 증후군, 천포창, 말초 신경병증, 정맥주위성 뇌척수막염, 악성 빈혈(PA: pernicious anemia), POEMS 증후군(다발성 신경병증, 장기 종대, 내분비병증, 모노클로날 gammaglobulin 병증, 피부 변화), 결절성 다발동맥염, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근육염, 심근경색증 증후군, 심막절개후 증후군, 원발성 담즙성 경화, 원발성 경화성 쓸개관염, 프로게스테론 피부염, 건선, 건선 관절염, 진정 적혈구계 무형성증(PRCA: pure red cell aplasia), 괴저성 농피증, 레이노(Raynaud) 현상, 반응성 관절염, 반사성 교감신경 위축증, 라이터(Reiter) 증후군, 재발성 다발성 연골염, 하지불안 증후군(RLS: restless legs syndrome), 후복막 섬유화증, 류마티스열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 슈미트(Schmidt) 증후군, 공막염, 경피증, 쇼그伦(Sjogren) 증후군, 정자 및 고환 자가면역, 강직 인간 증후군, 아급성 박테리아성 심내막염(SBE: subacute bacterial endocarditis), 수삭(Susac) 증후군, 교감성 안염(SO: sympathetic ophthalmia), 타카야수(Takayasu) 동맥염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 혈소판 감소성 자반증(TTP: thrombocytopenic purpura), 톨로사-헌트(Tolosa-Hunt) 증후군(THS), 횡단성 척수염, 1형 당뇨병, 궤양성 대장염(UC: ulcerative colitis), 미분화 결합 조직 질환(UCTD: Undifferentiated connective tissue disease), 포도막염, 혈관염, 백반증, 및 베게너(Wegener) 육아종증(다발성 혈관염이 있는 육아종증(GPA: Granulomatosis with Polyangiitis)).

[0344]

본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 전형적으로 환자가 회복할 때까지 환자의 시스템에서 폴리펩티드의 치료 유효 수준을 유지하는 빈도로 투여된다. 예를 들어, 폴리펩티드는 적어도 약 1, 2, 5, 10, 20, 30, 또는 40개의 폴리펩티드가 각각의 표적 분자 또는 세포에 결합하기에 충분한 혈청 농도를 달성하는 빈도로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6주마다, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월마다 투여된다.

[0345]

다양한 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)를 투여하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있으며, 아래에서 설명된다. 사용되는 폴리펩티드의 적합한 투여량은 대상체의 연령 및 체중, 및 사용되는 특정 약물에 따라 결정될 것이다.

[0346]

폴리펩티드는 단독으로 사용되거나 또는 제2 작용제, 예를 들어 항박테리아제, 독소 또는 단백질, 예를 들어 제2 폴리펩티드에 접합될 수 있다. 이 방법은 폴리펩티드를 단독으로 또는 제2 작용제에 접합된 상태로, 그 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 폴리펩티드는 다양한 치료제, 예를 들어 독소 또는 그의 혼합물을 전달하기 위해 사용될 수 있다.

[0347]

조합 요법

[0348]

폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 융합 단백질)는 다른 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어 본원에서 설명되는 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 제제화되고/되거나 동시 투여되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 다른 치료 방식, 예를 들어 본원에서 설명되는 다른 치료 방식과 조합하여 투여된다. 이러한 조합 요법은 유리하게는 투여되는 치료제를 보다 낮은 투여량을 이용함으로써, 다양한 단계 요법과 연관된 독성 또는 합병증의 가능성을 피할 수 있다.

[0349]

본원에서 사용되는 바와 같이, "조합하여" 투여된다는 것은 2개(이상)의 상이한 치료제를 대상체가 장애를 겪기 전, 또는 겪는 과정 동안 대상체에 전달하는 것을 의미한다. 한 실시양태에서, 2개 이상의 치료제는 예를 들어 대상체가 장애를 갖거나 장애로 진단받기 전에 예방적으로 전달된다. 또 다른 실시양태에서, 2개 이상의 치료제는 대상체에 장애가 발생하였거나 장애로 진단된 후에 전달된다. 일부 실시양태에서, 한 치료제의 전달은 제2

전달이 시작될 때 여전히 시행되고 있어 겹치게 된다. 이것은 때로는 "동시" 또는 "병용 전달"로도 언급된다. 다른 실시양태에서, 한 치료제의 전달은 다른 치료제의 전달이 시작하기 전에 종료된다. 두 경우의 일부 실시양태에서, 치료제의 효과는 조합 투여로 인해 더 커진다. 예를 들어, 제2 치료제는 보다 효과적이거나, 예를 들어, 보다 적은 제2 치료제로도 동등한 효과가 관찰되거나, 제2 치료제는 제1 치료제 없이 제2 치료제가 투여되는 경우에 관찰되는 것보다 더 큰 정도로 증상을 감소시키거나, 유사한 상황이 제1 치료제에 대해서도 관찰된다. 일부 실시양태에서, 전달은 장애와 관련된 증상 또는 다른 파라미터의 감소를, 다른 치료제 없이 전달되는 하나의 치료제의 사용시에 관찰되는 것보다 더 크게 만든다. 2개의 치료제의 효과는 부분적으로 상가적이거나, 완전히 상가적이거나, 또는 상가적 효과보다 클 수 있다. 전달은 제2 치료제가 전달될 때 전달된 제1 치료제의 효과가 계속 검출 가능하도록 만들 수 있다.

[0350] 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 본원에서 설명되는 장애를 치료하거나 예방하기 위한 제2 요법(예를 들어, 추가의 작용제)과 조합하여 투여된다. 한 실시양태에서, 추가의 작용제는 제2 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자), 예를 들어 제1 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)와는 상이한 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)이다. 조합하여 사용될 수 있는 예시적인 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)는 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)의 임의의 조합을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 추가의 작용제는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자) 이외의 것이다. 예를 들어, 추가의 작용제는 소분자 또는 핵산 분자일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 제2 요법은 수술, 방사선 요법, 세포 요법(예를 들어, 줄기 세포 요법), 또는 장기 또는 조직 이식으로부터 선택된다.

[0351] 한 실시양태에서, 제2 요법은 다음 중 하나 이상으로부터 선택되는 요법을 포함한다: 안드로겐 대체 요법, 항호르몬 요법, 항혈청 요법, 자가 면역 강화 요법, 생물요법, 혈액 방사선 조사 요법, 근접 요법, 심장 재동기화 요법, 세포 요법, 세포 전달 요법, 킬레이션 요법, 화학 요법, 금요법(chrysotherapy), 코발트 요법, 냉압(cold compression) 요법, 동결 요법, 전기 충격 요법, 전자기 요법, 전자 요법, 전기 요법, 효소 대체 요법, 후성적 요법, 에스트로겐 대체 요법, 체외 충격 요법, 빠른 중성자 요법, 플루오라이드 요법, 유전자 요법, 열 치료, 기생충 요법, 호르몬 요법, 호르몬 대체 요법, 숙주 조절 요법, 고압 산소 요법, 온열 요법, 면역 억제 요법, 면역 요법, 수술 중 전자 방사선 요법, 수술 중 방사선 요법, 역위 요법, 레이저 요법, 광선 요법, 리튬 요법, 저수준 레이저 요법, 자기 요법, 자기 공명 요법, 의료용 가스 요법, 의료용 영양 요법, 분자 샤페론(chaperone) 요법, 분자 요법, 모노클로날 항체 요법, 공기 음이온화 요법, 중성자 포획 요법, 중성자 요법, 경구 수분 보충 요법, 삼투압 요법, 산소 요법, 오존 요법, 완화 요법, 입자 요법, 파지 요법, 음소 신경학적 크롬 요법(phonomimic neurological hypochromium therapy), 광역학 요법, 광요법, 광열 요법, 물리적 요법, 증식 요법, 단백질 요법, 양성자 요법, 펠스 전자기장 요법, PUVA 요법, 방사선 요법, 수분 보충 요법, 호흡 요법, 구제 요법, 혈청 요법, 줄기 세포 요법, 정위 방사선 요법, 표적 요법, 온열 요법, TK 세포 요법, 면역관용원 요법, 경피적 연속 산소 요법, 자외광 요법 또는 바이로테라피(virotherapy)를 포함한다.

[0352] 다른 장애를 치료하거나 예방하기 위해 본원에서 설명되는 폴리펩티드 또는 조성물과 조합하여 사용될 수 있는 예시적인 요법은 또한 본 명세서의 "장애를 치료하거나 예방하는 방법"의 섹션에 기재되어 있다.

진단 방법

[0354] 일부 측면에서, 본 개시내용은 시험관내에서(예를 들어, 생검 또는 체액(예를 들어, 혈액, 소변, 또는 뇌척수액) 샘플과 같은 생물학적 샘플에서) 또는 생체내에서(예를 들어, 대상체의 생체내 영상화) 표적 분자(예를 들어, 단백질) 또는 세포의 존재를 검출하기 위한 진단 방법을 제공한다. 이 방법은 (i) 샘플을 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 본원에서 설명되는 항체 분자)와 접촉시키거나, 또는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)를 대상체에게 투여하는 단계; (선택적으로) (ii) 참조 샘플, 예를 들어, 대조군 샘플(예를 들어, 생검 또는 체액(예를 들어, 혈액, 소변, 또는 뇌척수액) 샘플과 같은 대조군 생물학적 샘플) 또는 대조군 대상체를 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 본원에서 설명되는 항체 분자)와 접촉시키는 단계; 및 (iii) 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)와 샘플 또는 대상체, 또는 대조군 샘플 또는 대상체 사이의 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플 또는 대상체에 비해 샘플 또는 대상체에서의 복합체 형성의 변화, 예를 들어 통계적으로 유의한 변화는 샘플 내의 표적 분자 또는 세포의 존재를 나타낸다. 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)는 결합되거나 결합되지 않은 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)의 검출을 용이하게 하기 위해 검출 가능한 물질로 직접 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 적합한 검출 가능 물질은 본원에서 설명되는 바와 같은 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다.

[0355] 박테리아 검출에 사용되는 샘플을 언급할 때 용어 "샘플"은 세포, 세포 용해물, 세포의 단백질 또는 막 추출물,

혈액, 소변 또는 CSF와 같은 체액, 또는 조직 샘플, 예컨대 생검을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0356] 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)와 표적 분자 또는 세포 사이의 복합체 형성은 표적 분자 또는 세포에 결합된 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자), 또는 결합되지 않은 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)를 측정하거나 가시화함으로써 검출될 수 있다. 임의의 적합한 검출 검정이 이용될 수 있고, 통상적인 검출 검정은 효소 연결 면역 흡착 검정(ELISA), 방사 면역 검정(RIA) 또는 조직 면역조직화학법을 포함한다. 폴리펩티드를 표지하는 대안으로, 표적 분자 또는 세포의 존재는 검출 가능한 물질로 표지된 표준물질 및 비표지된 폴리펩티드를 이용하는 경쟁 면역 검정에 의해 샘플 내에서 검정될 수 있다. 본 검정에서, 생물학적 샘플, 표지된 표준물질 및 폴리펩티드를 합하고, 비표지된 결합 분자에 결합된 표지된 표준물질의 양을 결정한다. 샘플 내의 표적 분자 또는 세포의 양은 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)에 결합된 표지된 표준물질의 양에 반비례한다.

[0357] 본원에서 설명되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 분자)는 본원에서 설명되는 폴리펩티드에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 장애를 진단하기 위해 사용될 수 있다. 본원에서 설명되는 검출 또는 진단 방법은 본원에서 설명되는 장애를 치료하거나 예방하기 위해 본원에서 설명되는 다른 방법과 조합하여 사용될 수 있다.

[0358] 본 개시내용은 또한 다음 번호로 표시되는 단락들 중 어느 하나를 포함한다:

[0359] 1. 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드로서, 하기 특성 중 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13개 또는 전부를 갖고, 적어도, 특성 a), b)를 가지며, 특성 e), f), g), h) 또는 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 갖는 폴리펩티드:

[0360] a) 참조 폴리펩티드에 비해 pH 6.0 내지 6.5에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 증가된 결합 친화도를 보유함;

[0361] b) pH 7.0 내지 7.4에서의 FcRn에 대한 결합 친화도보다, pH 6.0 내지 6.5에서의 FcRn에 대한 결합 친화도가 더 높음;

[0362] c) pH 6.0 내지 6.5에서 300 nM 이하의 해리 상수(K_d)로 FcRn에 결합함;

[0363] d) pH 7.0 내지 7.4에서 50 nM 이상의 K_d 로 FcRn에 결합함;

[0364] e) 참조 폴리펩티드에 비해 Fc γ 수용체에 대해 동일한, 실질적으로 동일한, 또는 증가된 결합 친화도를 보유함;

[0365] f) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한, 또는 실질적으로 동일한 열 안정성을 보유함;

[0366] g) 참조 폴리펩티드에 비해 C1q에 대해 동일한, 실질적으로 동일한, 또는 증가된 결합 친화도를 보유함;

[0367] h) 참조 폴리펩티드에 비해 TRIM21에 대해 동일한, 실질적으로 동일한, 또는 증가된 결합 친화도를 보유함;

[0368] i) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한, 실질적으로 동일한, 또는 증가된 이펙터 기능을 보유함;

[0369] j) 참조 폴리펩티드에 비해 증가된 생체내 반감기를 보유함;

[0370] k) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한, 실질적으로 동일한, 또는 증가된, 시험관내, 생체외 또는 생체내에서의 생물학적 기능을 보유함;

[0371] l) 참조 폴리펩티드에 비해 동일한, 또는 실질적으로 동일한 현상성 특징을 보유함;

[0372] m) 참조 폴리펩티드에 비해 에피토프에 대해 동일한, 실질적으로 동일한, 또는 증가된 결합 친화도, 특이성, 또는 둘 모두를 보유함; 또는

[0373] n) 참조 폴리펩티드에 비해 점막 흡수를 증가시킴.

[0374] 2. 단락 1에 있어서, 적어도, 특성 a), b), c), d)를 갖고, 특성 e), f), g), h) 또는 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 갖는 폴리펩티드.

[0375] 3. 단락 1 또는 2에 있어서, 적어도, 특성 a), b)를 갖고, 특성 e), f), g), h) 또는 i) 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 가지며, 특성 c), d), j), k), l), m) 또는 n) 중 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 전부를 갖는 폴리펩티드.

[0376] 4. 단락 1 내지 3 중 어느 한 단락에 있어서, 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 pH 6.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화도가 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50배 증가된 폴리펩티드.

- [0377] 5. 단락 1 내지 4 중 어느 한 단락에 있어서, 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 6.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화도가 pH 7.4에서의 결합 친화도보다 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 또는 50배 더 높은 폴리펩티드.
- [0378] 6. 단락 1 내지 5 중 어느 한 단락에 있어서, 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 6.0에서 250 nM 이하, 200 nM 이하, 150 nM 이하, 100 nM 이하, 50 nM 이하, 25 nM 이하, 10 nM 이하, 5 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.05 nM 이하, 0.02 nM 이하, 0.01 nM 이하, 25 nM 내지 0.1 nM, 20 nM 내지 0.5 nM, 15 nM 내지 1 nM, 10 nM 내지 5 nM, 또는 20 nM 내지 10 nM의 해리 상수 (K_d)로 FcRn에 결합하는 폴리펩티드.
- [0379] 7. 단락 1 내지 6 중 어느 한 단락에 있어서, 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, pH 7.4에서 60 nM 이상, 80 nM 이상, 100 nM 이상, 150 nM 이상, 200 nM 이상, 500 nM 이상, 50 nM 내지 500 nM 또는 100 nM 내지 250 nM의 K_d 로 FcRn에 결합하는 폴리펩티드.
- [0380] 8. 단락 1 내지 7 중 어느 한 단락에 있어서, 옥텟 기반 검정 또는 세포 기반 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa/b$ 또는 $Fc\gamma RIII$ 중 1, 2개 또는 전부에 대한 결합 친화도를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa/b$ 또는 $Fc\gamma RIII$ 중 1, 2개 또는 전부에 대한 결합 친화도를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키는 것인 폴리펩티드.
- [0381] 9. 단락 1 내지 8 중 어느 한 단락에 있어서, 시프로 오렌지 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 융점율 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C 또는 10°C 이하만큼 증가시키거나 감소시키는 폴리펩티드.
- [0382] 10. 단락 1 내지 9 중 어느 한 단락에 있어서, ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 C1q에 대한 결합 친화도를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 C1q에 대한 결합 친화도를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키는 폴리펩티드.
- [0383] 11. 단락 1 내지 10 중 어느 한 단락에 있어서, ELISA에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 TRIM21에 대한 결합 친화도를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 TRIM21에 대한 결합 친화도를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키는 폴리펩티드.
- [0384] 12. 단락 1 내지 11 중 어느 한 단락에 있어서, 참조 폴리펩티드에 비해 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP) 또는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN) 중 1, 2, 3개 또는 전부를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP) 또는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN) 중 1, 2, 3개 또는 전부를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키는 폴리펩티드.
- [0385] 13. 단락 1 내지 12 중 어느 한 단락에 있어서, 동물 모델에서 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 생체내 반감기가 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 증가된 폴리펩티드.
- [0386] 14. 단락 1 내지 13 중 어느 한 단락에 있어서, 참조 폴리펩티드에 비해 시험관내, 생체외 또는 생체내에서의 생물학적 기능을 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서의 생물학적 기능을 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키는 폴리펩티드.
- [0387] 15. 단락 1 내지 14 중 어느 한 단락에 있어서, 참조 폴리펩티드에 비해 안정성, 용해도, 응집, 또는 발현 수준 중 1, 2, 3개 또는 전부를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 변경하는 폴리펩티드.
- [0388] 16. 단락 1 내지 15 중 어느 한 단락에 있어서, 참조 폴리펩티드에 비해 결합 친화도, 특이성 또는 둘 모두를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이하만큼 감소시키거나, 또는 결합 친화도, 특이성 또는 둘 모두를 적어도 1.5, 2, 3, 4 또는 5배 증가시키는 것인 폴리펩티드.
- [0389] 17. 단락 1 내지 16 중 어느 한 단락에 있어서, 트랜스시토시스 검정에 의해 결정시에, 참조 폴리펩티드에 비해 점막 흡수를 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 증가시키는 폴리펩티드.
- [0390] 18. 단락 1 내지 4 및 8 내지 17 중 어느 한 단락에 있어서, 참조 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역, 서열 번호 1의 아미노산 서열, 또는 이 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 동일하거나 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 것인 폴리펩티드.
- [0391] 19. 단락 1 내지 18 중 어느 한 단락에 있어서, 돌연변이가 CH₂ 도메인 내의 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.

- [0392] 20. 단락 1 내지 18 중 어느 한 단락에 있어서, 돌연변이가 CH3 도메인 내의 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0393] 21. 단락 1 내지 20 중 어느 한 단락에 있어서, CH2 도메인 내의 잔기에서의 적어도 하나의 돌연변이 및 CH3 도메인 내의 잔기에서의 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0394] 22. 단락 1 내지 21 중 어느 한 단락에 있어서, CH2 도메인 및/또는 CH3 도메인 이외의 영역 내의 잔기에 돌연변이를 추가로 포함하는 폴리펩티드.
- [0395] 23. 단락 1 내지 22 중 어느 한 단락에 있어서, 돌연변이가 CH2 도메인과 CH3 도메인 사이의 링커 영역의 입체형태를 변경하지 않거나, 또는 실질적으로 변경하지 않는 것인 폴리펩티드.
- [0396] 24. 단락 1 내지 23 중 어느 한 단락에 있어서, 돌연변이가 표면 영역 상에 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 연속적인 소수성 또는 방향족 잔기를 도입하지 않는 것인 폴리펩티드.
- [0397] 25. 단락 1 내지 24 중 어느 한 단락에 있어서, 항체 분자를 포함하는 폴리펩티드.
- [0398] 26. 단락 1 내지 25 중 어느 한 단락에 있어서, IgG를 포함하는 폴리펩티드.
- [0399] 27. 단락 1 내지 26 중 어느 한 단락에 있어서, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하는 폴리펩티드.
- [0400] 28. 단락 1 내지 27 중 어느 한 단락에 있어서, 중쇄 면역글로불린 가변 영역, 경쇄 면역글로불린 가변 영역, 또는 둘 모두를 포함하는 폴리펩티드.
- [0401] 29. 단락 1 내지 28 중 어느 한 단락에 있어서, 2개의 중쇄 면역글로불린 가변 영역 및 2개의 경쇄 면역글로불린 가변 영역의 사량체를 포함하는 폴리펩티드.
- [0402] 30. 단락 1 내지 29 중 어느 한 단락에 있어서, 전장 항체 분자를 포함하는 폴리펩티드.
- [0403] 31. 단락 1 내지 30 중 어느 한 단락에 있어서, 항체 분자의 단편을 포함하는 폴리펩티드.
- [0404] 32. 단락 1 내지 31 중 어느 한 단락에 있어서, 키메라 항체 분자 또는 뮤린 항체 분자를 포함하는 폴리펩티드.
- [0405] 33. 단락 1 내지 32 중 어느 한 단락에 있어서, 인간 항체 분자 또는 인간화 항체 분자를 포함하는 폴리펩티드.
- [0406] 34. 단락 1 내지 24 중 어느 한 단락에 있어서, 융합 단백질을 포함하는 폴리펩티드.
- [0407] 35. 단락 1 내지 34 중 어느 한 단락에 있어서, 다음 중 1, 2, 3, 4개 또는 전부를 포함하는 폴리펩티드:
- [0408] (i) FcRn과 상호작용하는 표면 영역 내의 잔기에서의 돌연변이;
- [0409] (ii) Fc-FcRn 계면을 따른 말초 잔기인 잔기에서의 돌연변이;
- [0410] (iii) Fc-FcRn 결합에서 비접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이;
- [0411] (iv) P247, K248, D249, T250, L251 또는 M252 중 1, 2, 3, 4, 5개 또는 전부를 포함하는 나선의 입체형태적 역동성을 향상시키는 나선 접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이; 또는
- [0412] (v) 히스티딘의 pK를 조절하거나 Fc-FcRn 계면을 따른 히스티딘의 도입인 돌연변이.
- [0413] 36. 단락 1 내지 35 중 어느 한 단락에 있어서, FcRn과 상호작용하는 표면 영역 내의 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0414] 37. 단락 36에 있어서, 돌연변이가 L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435, 또는 Y436으로부터 선택되는 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0415] 38. 단락 1 내지 37 중 어느 한 단락에 있어서, L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435, 또는 Y436으로부터 선택되는 잔기 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16개 또는 전부에서의 다수의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0416] 39. 단락 1 내지 38 중 어느 한 단락에 있어서, Fc-FcRn 계면을 따른 말초 잔기인 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0417] 40. 단락 39에 있어서, 돌연변이가 M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286 또는 K288로부터 선택되는 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0418] 41. 단락 1 내지 40 중 어느 한 단락에 있어서, M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286 또는

K288로부터 선택되는 잔기 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부에서의 다수의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.

- [0419] 42. 단락 1 내지 41 중 어느 한 단락에 있어서, Fc-FcRn 결합에서 비접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0420] 43. 단락 1 내지 42 중 어느 한 단락에 있어서, 돌연변이가 A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430 또는 A431로부터 선택되는 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0421] 44. 단락 1 내지 43 중 어느 한 단락에 있어서, A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430 또는 A431로부터 선택되는 잔기 중 2, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 전부에서의 다수의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0422] 45. 단락 1 내지 44 중 어느 한 단락에 있어서, P247, K248, D249, T250, L251 또는 M252 중 1, 2, 3, 4, 5개 또는 전부를 포함하는 나선의 입체형태적 역동성을 향상시키는 나선 접촉 잔기인 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0423] 46. 단락 45에 있어서, 돌연변이가 P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306 또는 H427로부터 선택되는 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0424] 47. 단락 1 내지 46 중 어느 한 단락에 있어서, P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306 또는 H427로부터 선택되는 잔기 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13개 또는 전부에서의 다수의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0425] 48. 단락 1 내지 47 중 어느 한 단락에 있어서, Fc-FcRn 계면을 따른 히스티딘의 도입인 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0426] 49. 단락 1 내지 48 중 어느 한 단락에 있어서, 표 1에 기재된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 돌연변이, 또는 돌연변이의 하나 이상의 조합을 포함하는 폴리펩티드.
- [0427] 50. 단락 1 내지 49 중 어느 한 단락에 있어서, 돌연변이가 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, T256E, 또는 이들의 조합 이외의 돌연변이인 폴리펩티드.
- [0428] 51. 단락 1 내지 50 중 어느 한 단락에 있어서, 돌연변이가 잔기 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250, M428, N434, N434, T307, E380, N434, M252, S254, T256, 또는 이들의 조합 이외의 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0429] 52. 단락 1 내지 51 중 어느 한 단락에 있어서, 하기 돌연변이 또는 돌연변이들 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부를 갖지 않는 폴리펩티드: (i) M252Y, S254T, 및 T256E; (ii) L309N; (iii) T250Q 및 M428L; (iv) M428L 및 N434A; (v) N434A; (vi) T307A, E380A, 및 N434A; (vii) M252W; (viii) V308F; (ix) V308F 및 N434Y; 또는 (x) H435A.
- [0430] 53. 단락 1 내지 52 중 어느 한 단락에 있어서, M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, 또는 T256E로부터 선택되는 제1 돌연변이, 및 M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, 및 T256E 이외의, 표 1의 돌연변이로부터 선택되는 제2 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.
- [0431] 54. 단락 1 내지 53 중 어느 한 단락에 있어서, 이펙터 기능을 증가시키는, Fc 영역에서의 돌연변이를 추가로 포함하는 폴리펩티드.
- [0432] 55. 단락 54에 있어서, 돌연변이가 S239, A330, I332, F243, G236 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0433] 56. 단락 1 내지 55 중 어느 한 단락에 있어서, 이펙터 기능을 감소시키는, Fc 영역에서의 돌연변이를 추가로 포함하는 폴리펩티드.
- [0434] 57. 단락 56에 있어서, 돌연변이가 K322, L234, L235, P331, N297 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 잔기에 존재하는 것인 폴리펩티드.
- [0435] 58. 단락 1 내지 57 중 어느 한 단락에 있어서, Fc 영역이
- [0436] (a) T256D/Q311V/A378V, H285N/T307Q/N315D, H285D/T307Q/A378V, T307Q/Q311V/A378V,

T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V, 또는 T256D/T307R/Q311V로부터 선택되는 돌연변이의 조합 중 1, 2, 3, 4, 5개 또는 전부;

[0437] (b) Fc 이펙터 기능을 방해할 수 있는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합, 또는

[0438] (c) (a)와 (b) 둘 모두

[0439] 를 포함하는 것인 폴리펩티드.

[0440] 59. 단락 1 내지 58 중 어느 한 단락에 있어서, (i) T256, Q311, 및 A378; (ii) H285, T307, 및 N315; (iii) H285, T307, 및 A378; (iv) T307, Q311, 및 A378; (v) T256, N286, T307, Q311, 및 A378; 또는 (vi) T256, H285, T307, Q311, 및 A378로부터 선택되는 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.

[0441] 60. 단락 1 내지 59 중 어느 한 단락에 있어서, (i) T256D, Q311V, 및 A378V; (ii) H285N, T307Q, 및 N315D; (iii) H285D, T307Q, 및 A378V; (iv) T307Q, Q311V, 및 A378V; (v) T256D, N286D, T307R, Q311V, 및 A378V; 또는 (vi) T256D, H285D, T307R, Q311V, 및 A378V로부터 선택되는 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드.

[0442] 61. 단락 1 내지 60 중 어느 한 단락에 있어서, Fc 영역 이외의 영역에서의 돌연변이를 추가로 포함하는 폴리펩티드.

[0443] 62. 단락 1 내지 61 중 어느 한 단락에 있어서, 다수의 돌연변이를 포함하고, 적어도 하나의 돌연변이가 보상성 또는 유익성 돌연변이인 폴리펩티드.

[0444] 63. 단락 1 내지 62 중 어느 한 단락에 있어서, 단리된 폴리펩티드인 폴리펩티드.

[0445] 64. 단락 1 내지 62 중 어느 한 단락에 있어서, 합성 폴리펩티드인 폴리펩티드.

[0446] 65. 단락 1 내지 64 중 어느 한 단락의 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

[0447] 66. 단락 65에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

[0448] 67. 단락 1 내지 64 중 어느 한 단락의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자.

[0449] 68. 단락 67의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

[0450] 69. 단락 67의 핵산 분자 또는 단락 68의 벡터를 포함하는 세포.

[0451] 70. 단락 1 내지 64중 어느 한 단락의 폴리펩티드 및 이 폴리펩티드의 사용 설명서를 포함하는 키트.

[0452] 71. 단락 1 내지 64 중 어느 한 단락의 폴리펩티드를 포함하는 용기.

[0453] 72. 항체 분자의 생산을 허용하는 조건 하에서 단락 69의 세포를 배양하여 폴리펩티드를 생산하는 단계를 포함하는, 폴리펩티드의 생산 방법.

[0454] 73. 단락 72에 있어서, 폴리펩티드를 단리하거나 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0455] 74. 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 단락 1 내지 64 중 어느 한 단락의 폴리펩티드, 또는 단락 65 또는 66의 조성물의 유효량을 투여하여 장애를 치료하는 단계를 포함하는, 장애의 치료 방법.

[0456] 75. 대상체의 장애 치료에 사용하기 위한, 단락 1 내지 64 중 어느 한 단락의 폴리펩티드 또는 단락 65 또는 66의 조성물.

[0457] 76. 대상체의 장애 치료를 위한 의약의 제조에서의, 단락 1 내지 64 중 어느 한 단락의 폴리펩티드, 또는 단락 65 또는 66의 조성물의 용도.

[0458] 77. 대상체로부터의 세포 또는 샘플을 단락 1 내지 64 중 어느 한 단락의 폴리펩티드와 접촉시켜 분자를 검출하는 단계를 포함하는, 분자의 검출 방법.

0459] 실시예

[0460] 다수의 Fc 수용체(예를 들어, FcRn, C1q, TRIM21, Fc γ RI, Fc γ RIIa/b 및 Fc γ RIIIa)와 IgG의 결합을 조사하기 위해 구조 및 네트워크 기반 프레임워크가 개발되었다. 이 프레임워크를 사용하여, Fc-FcRn 상호작용을 제어하는 특징 및 pH 특이적 방식으로 FcRn 결합을 향상시키는 다수의 별개의 경로가 확인되었다. 네트워크 분석은 FcRn 최적화 돌연변이가 말단 Fc γ R 결합에 미치는 알로스테릭 효과를 연구하기 위한 렌즈를 제공하였다. 이러한 원리를 적용하여, 견고한 생물물리학적 특성 및 활성화 수용체에 대한 야생형 유사 결합으로 FcRn 결합을 향

상시키는 별개의 Fc 변이체의 패널을 조작하였다. 이러한 Fc 변이체를 갖는 대조군 폴리펩티드는 9배 초과의 반감기 개선 및 ADCC, ADCP, CDC, 및 TRIM21에 의해 매개되는 ADIN과 같은 견고한 이펙터 기능을 나타내었다.

[0461] 실시예 1: Fc-FcRn 상호작용의 구조적 특성화 및 분자적 특징

인간 IgG1의 Fc 도메인 및 인간 혈청 알부민과 복합체화된 인간 FcRn 단백질의 결합 구조가 최근에 보고되었다(Oganesyan et al., *J Biol Chem*, 2014. 289 (11): 7812-2). 구조의 검사(도 20a)는 FcRn 분자의 알파 및 베타 서브유닛 둘 모두가 Fc- 도메인에 결합하여 Fc의 CH2 및 CH3 도메인 둘 모두와 접촉하게 됨을 보여준다. 1차 상호작용은 FcRn 측의 알파 서브유닛 및 Fc 측의 CH2 도메인에 의해 매개된다. 결합의 pH 특이성은 산성 pH에서 양성자화를 겪고 위치 115의 FcRn 글루타메이트 및 위치 130의 아스파르테이트와의 중요한 접촉을 만드는 위치 310 및 435(카바트 넘버링)의 히스티딘 잔기에 의해 유도된다. 2개의 히스티딘 잔기 중 어느 하나의 돌연변이는 FcRn에 대한 Fc의 결합 친화도를 현저하게 감소시킨다(Oganesyan et al., *J Biol Chem*, 2014. 289(43): 29874-80; Raghavan et al., *Biochemistry*, 1995. 34(45): 14649-57). H310 및 H435 이외에, 많은 다른 Fc 잔기 (L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H433, N434, 및 Y436)가 FcRn과의 분자 접촉에 관련된다.

Fc의 구조는 상이한 pH에서 밝혀졌다(Crispin et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(38): E3544-6; Ahmed et al., *J Mol Biol*, 2014. 426(18): 3166-79; Chen et al., *ACS Chem Biol*, 2016. 11(7): 1852-61). pH 4.0(pdb id 4BYH) 및 6.5(pdb id 4Q7D)에서 Fc의 결합 구조의 종첩은 250-나선의 횡방향 변위 및 CH2의 상대적인 배향의 차이를 비롯한 많은 미세한 변화를 나타낸다(도 20b). M252 및 I253과 같은 FcRn 결합 아미노산 잔기가 250-나선에 위치한다는 것을 고려할 때, 나선의 관찰된 변위는 FcRn 결합에 영향을 줄 것으로 예상된다(Oganesyan et al., *J Biol Chem*, 2014. 289 (11): 7812-2). 또한, CH3에 대한 CH2의 상대적인 배향의 차이는 CH2 영역의 입체형태적 유연성을 강조한다(도 20b)(Frank et al., *J Mol Biol*, 2014. 426(8): 1799-811). FcRn-Fc 계면이 Fc의 CH2/CH3 도메인 둘 모두에 걸쳐 발견되는 것을 고려할 때, CH2 도메인의 입체형태적 역동성이 또한 FcRn 결합에 영향을 줄 것으로 예상된다. 산성 및 중성 pH에서 FcRn의 존재 및 부재 하에서의 Fc 잔기에 대한 중수소 교환 연구는 Fc 분자에 결합하는 FcRn이 그의 결합 Fc 잔기에 대한 보호를 제공함을 보여주었지만; FcRn 분자가 없는 경우, 산성 pH에서 250-나선 잔기는 중수소 교환의 향상을 나타내었고, 이것은 pH 변화가 상기 영역에 대한 입체형태적 변화를 유도함을 시사한다(Walters et al., *J Biol Chem*, 2016. 291(4): 1817-25; Jensen et al., *Mol Cell Proteomics*, 2017. 16(3): 451-456).

산성 pH에서 Fc와 FcRn의 결합 강도를 분석하면, 인간 FcRn이 약한 친화도(> 600 nM)로 인간 Fc 도메인에 결합한다는 것을 알 수 있다. 동역학적 파라미터는 Fc-FcRn 상호작용의 회합 속도($k_{on} \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$)가 통상적인 항체-항원 상호작용과 대등하지만, 보다 낮은 결합 친화도는 주로 Fc-FcRn 상호작용의 빠른 해리 속도($k_{off} \sim 0.1 \text{ s}^{-1}$)에 기인한 것임을 추가로 보여준다(Suzuki et al., *J Immunol*, 2010. 184(4): 1968-76). CH2 하위도메인의 입체형태적 유연성은 FcRn 결합의 불량한 k_{off} 에 기여하는 것으로 생각된다. Fc-FcRn 상호작용의 오프 속도를 개선하는 것은 개선된 반감기에 대한 핵심적인 측면으로 작용할 수 있다(Datta-Mannan et al., *J Biol Chem*, 2007. 282(3): 1709-17).

이를 달성하기 위해, 그에 대한 돌연변이가 FcRn 상호작용 및 해리 속도(k_{off})에 영향을 줄 수 있는 4 세트의 Fc 잔기가 확인되었다(도 21a). 이것은 FcRn과 직접 접촉하는 잔기뿐만 아니라, 상호작용 표면을 변형하는 잠재성을 갖는 말초 및 비표면 노출된 잔기 및 250-나선 역동성에 영향을 줄 수 있는 잔기를 포함한다. 실제로, 이들 위치 중 일부는 이전에 조사되었고, M252Y/S254T/T256E (YTE), M428L/N434S (LS), T307A/E380A/N434A (AAA), T250Q/M428L (QL), V308P와 같은 반감기 연장 돌연변이체는 나열된 부위에서의 돌연변이의 조합을 포함한다.

[0466] 분석에서, 각각의 잔기의 역할은 인 실리코(*in silico*) 방식으로 먼저 조사되었고, 잔기에 의해 매개되는 상호작용 네트워크가 확인되었다(도 21b). 특정 세트의 돌연변이는 Fc-FcRn 계면에서 소수성 상호작용을 향상시키고 Fc-FcRn 계면의 주변에서 극성 및 정전기 상호작용을 향상시키도록 설계되었다. 계면 근처의 비접촉 잔기의 돌연변이는 k_{off} 를 감소시킴으로써 정전하 상보성(electrostatic charge complementarity) 및 친화도를 향상시킬 수 있다(Lee and Tidor, *Protein Sci*, 2001. 10(2): 362-77; Whitehead et al., *Nat Biotechnol*, 2012. 30(6): 543-8). Fc 상의 FcRn 결합 부위는 세포내 수용체 TRIM21, 항체 정제에 사용되는 단백질 A 및 CDC 활성을 위한 IgG의 육량체화 동안 형성된 Fc-Fc 상호작용 계면의 결합 부위와 중첩된다. 각 위치에서의 치환을 TRIM21, 단백질 A 및 Fc에 대한 결합에 미치는 영향에 대해 평가하였다. 치환을 위해 30개 초과의 별개의 위치가

선정되었다. 개별 돌연변이의 조합은 다음 가이드 원칙에 기초하여 설계되었다: (a) 용매 이온에 대한 결합 및 IgG의 열 안정성에 미치는 영향을 최소화하기 위해 큰 전하 또는 소수성 클러스터의 도입을 피하고, (b) 정전기 또는 소수성이 아닌, 상호작용의 유형에 다양한 유형을 포함시키고, (c) CH2 및 CH3 도메인에 걸친 돌연변이를 포함한다. 이러한 고려 사항을 기초로 하여, 150개 초과의 특유한 돌연변이 조합이 설계되고, 실험을 통해 평가되었다.

[0467] 설계된 Fc 변이체를 악특수맙 또는 모타비주맙 Fab 상에 포함하는 IgG1을 재조합 방식으로 발현시키고, 다음과 같은 2개의 상이한 프로토콜을 사용하여 생물층 간섭 측정에 의해 인간 FcRn에 대한 결합을 평가하였다: 분석물로서 IgG를 사용하는 NiNTA 바이오센서 상의 FcRn 및 분석물로서 FcRn을 사용하는 항-CH1 바이오센서 상의 IgG. 측정은 pH 6.0에서 결합을 정량한 후, pH 6.0 및 pH 7.4에서 해리를 정량하고, 7.4에서 결합 및 해리를 정량하기 위해 사용되었다(도 11a). P257 및 V308에 돌연변이를 포함하는 Fc 변이체는 pH 6.0에서 높은 친화도를 나타내지만, pH 7.4에서 현저하게 더 느린 오프 속도를 나타내었고, 추가의 분석에서 고려되지 않았다. 10개 초과의 별개의 변이체는 WT Fc를 갖는 IgG에 비해 5배 초과의 K_d 감소를 나타내었다. 또한, 이를 변이체는 K_{off} 를 2.5배 초과만큼 감소시켰다(도 22).

[0468] Fc 도메인 상의 FcRn 결합 부위는 그의 복잡한 결정 구조로부터 결정된 바와 같이 단백질 A 및 Trim21 결합 부위와 상당히 중첩된다(도 27a). Fc 도메인은 또한 CDC를 매개하기 위해 C1q에 결합하지만, C1q 결합 부위는 Fc 상의 FcRn 결합 부위와 중첩되지 않는다. C1q은 자연에서 육량체로 발견되고, Fc 도메인의 동종 육량체 조립체는 보다 우수한 C1q 결합뿐만 아니라 CDC를 나타낼 것으로 예상된다. 동종 육량체 형성을 위한 Fc-Fc 계면은 FcRn 결합 부위와 중첩된다(도 27a). Fc 도메인의 결정 구조의 중첩은 이러한 구조에서 CH2 도메인의 배향이 CH2 도메인의 입체형태적 유연성을 제시하는 CH3 도메인에 대해 다양하다는 것을 보여준다(도 27b). FcRn 결합 부위는 CH2 및 CH3 도메인 둘 모두에 걸친 계면에 존재하기 때문에, 상기 입체형태적 유연성은 그의 결합을 위해 중요할 수 있다.

실시예 2: pH 특이적 Fc-FcRn 결합에 대한 Fc 영역 돌연변이의 영향

[0469] Fc 변이체 FcMut008 및 FcMut015의 FcRn 결합 친화도를 옥텟에 의해 평가하였다. 항체는 항-CH1 항체에 의해 옥텟 텁에 고정되고, FcRn은 용액에 존재하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, FcMut008 및 FcMut015는 FcRn에 대한 증가된 친화도를 가졌다. 결합은 pH 특이적이고, pH 6.0에서 증가된 결합이 관찰되었다.

실시예 3: 세포 기반 FcRn 결합 경쟁 검정

[0470] 세포 기반 경쟁 검정은 Fc 변이체의 상대적인 결합의 차이를 나타내는 강력하고 특이적인 선형 측정을 제공한다. FcRn 발현 세포는 FcRn 알파 및 $\beta 2m$ 의 일시적인 형질감염에 의해 수득하였다. 세포를 IgG 회색액 및 고정된 농도의 형광 표지된 Fc(Fc-A488)과 함께 pH6.0에서 인큐베이팅하였다. 세포 결합 형광은 FACS에 의해 판독되었다. 그 결과를 도 1에 나타내었다. FcMut008 및 FcMut015는 pH6.0에서 개선된 FcRn 결합을 나타내었다.

실시예 4: Fc x R 결합에 대한 Fc 영역 돌연변이의 효과

[0471] Fc γ RI 및 Fc γ RIIIa에 대한 예시적인 돌연변이체 항체 분자의 결합을 결정하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, FcMut008 및 FcMut015는 Fc γ R 결합을 보유하였고, 일부 경우에는 향상된 Fc γ R 결합을 보유하였다.

실시예 5: Fc 변이체의 열 안정성 및 생물학적 특성에 대한 Fc 영역 돌연변이의 영향

[0472] 예시적인 돌연변이체 항체 분자의 열 안정성을 결정하였다. 열 안정성은 시프로 오렌지에 의해 측정하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, FcMut008 및 FcMut015는 높은 응점을 보유하였다.

[0473] 예시적인 Fc 변이체 도입이 생물학적 특성에 대해 미치는 영향을 실험에 의해 평가하였다. 모타비주맙 Fab 상에 Fc 변이체를 도입한 IgG를 SE-HPLC에서 시험하였다. 모든 샘플은 야생형 Fc와 유사한 체류 시간에서 용리되었고, 분명한 단량체 프로파일을 나타내었으며, 응집체는 검출되지 않았다(도 23). IgG는 또한 시차 주사 형광 측정법(DSF)에 의해 CH2 및 CH3 도메인의 열 안정성에 대해 평가되었다. 시차 주사 열량 측정에 의해 측정된 야생형 인간 CH2 및 CH3 도메인의 응점(T_m)은 각각 약 70°C 및 81.5°C이다(Ionescu *et al.*, *J Pharm Sci*, 2008, 97(4): 1414-26). 이 실시예에서 DSF 실험 결과는 CH2 및 CH3 T_m 이 각각 68.8°C 및 80.8°C로서 유사한 결과를 제시하였다. 반감기 연장 Fc 변이체 YTE는 CH2의 T_m 을 6.7°C 감소시키는 것으로 보고되었다(Majumdar *et al.*, *MAbs*, 2015, 7(1): p. 84-95). 본 실시예에서 설명된 실험에서, YTE의 CH2 도메인의 T_m 은 WT보다 7.2°C 더 낮았다. 또한, 247, 257 및 308의 돌연변이는 CH2의 T_m 에 유의한 영향을 미쳤다. 예시적인 Fc 변이체(FcMut183,

FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228, FcMut229)는 CH2 도메인의 T_m 이 64°C를 초과하여 열적으로 안정하였다(도 23).

[0478] 실시예 6: 트랜스제닉 마우스 모델에서 Fc 변이체의 평가

[0479] Tg32 마우스는 8주령의 동형접합성 수컷이었다. 시험 물질군당 4마리의 마우스를 사용하였다. 시험 물질은 CDA1-WT, CDA1-FcMut008 및 CDA1-FcMut015를 포함하였다. 마우스에게 IV 투여에 의해 10 mg/Kg으로 투여하였다. 데이터는 13개의 시점(1시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 6일, 8일, 10일, 13일, 16일 및 22일)에서 수집하였다. 인간 IgG는 항-hIgG 폴리클로날 항체를 사용하여 ELISA에 의해 정량화하였다.

[0480] Tg32는 모노클로날 항체의 인간 약동학의 초기 평가 및 예측을 위한 약물 발견에 사용될 수 있는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 모델이다. Tg32 동형접합 마우스의 모노클로날 항체 제거는 인간에서 모노클로날 항체 제거와 가장 밀접한 상관관계가 있다(Avery *et al.* *Mabs*. 2016; 8(6):1064-78).

[0481] CDA1(악특수맙)은 인간에서 25일 초파의 반감기를 나타내는 것으로 알려져 있다. Tg32 모델에서 추가의 mAb를 이용한 생체내 평가를 수행하였다. IgG 변이체 사이에서 증가된 반감기 차이를 갖는 것으로 보고된 다른 구축물도 Tg276 마우스에 대해 평가될 수 있다. 그 결과를 표 2 및 도 10에 제시한다. FcMut015는 Tg32 마우스에서 CDA1의 반감기를 증가시켰다.

[0482] <표 2> Tg32 동형접합 마우스에서 예시적인 항체 분자의 반감기

군	$t_{1/2}$ (hr)	C_{max} (ug/ml)	C_{last} (ug/ml)	AUC_{inf} (hr*ug/ml)	Rsq
WT	261.17	116.03	15.40	24108.03	0.99
FcMut008	231.92	131.33	15.74	25687.39	0.99
FCMut015	436.69	151.82	27.69	42735.9	0.93

[0483]

[0484] 실시예 7: 예시적인 항체의 Fc 조작

[0485] FcRn의 IgG와의 상호작용은 Fc를 통해 매개되는 것으로 생각된다. FcRn에 대한 Fc의 결합은 일반적으로 pH 특이적이다(전형적으로 pH7.4에서는 거의 또는 전혀 결합하지 않고, 산성 환경에서 강하게 결합함). IgG1의 Fc 도메인과 복합체화된 FcRn의 구조는 공지되어 있고, 각각의 FcRn 분자는 Fc-단량체에 결합한다. Fab 도메인은 FcRn에 대한 IgG의 결합에도 영향을 미칠 수 있다.

[0486] Fc-FcRn 복합체의 네트워크 분석은 FcRn과의 결합에서 H310의 중요성을 강조한다. H310은 고도로 네트워크화된 다른 여러 잔기에 고도로 상호 연결되어 있다. H310 클러스터에서의 돌연변이 및 이웃하는(연결된 노드) 돌연변이는 H310 네트워크를 강화할 수 있다. 하위 네트워크의 분석은 다른 Fc 잔기에 대한 영향을 최소화하면서 유리한 FcRn 상호작용을 위한 상승작용성 돌연변이의 도입을 보여준다.

[0487] pH 6.0에서 FcRn에 대한 개선된 결합을 보이는 Fc 변이체를 확인하기 위해, 다양한 Fc 돌연변이를 IgG1 모타비주맙(WT) 내로 조작하였다. 생물층 간섭 측정을 사용하여 모든 항체를 FcRn에 대한 결합에 대해 평가하였다. 간단히 설명하면, 항-CH1 바이오센서(ForteBio)에 각각의 관심 있는 항체를 로딩하였다. 로딩된 바이오센서를 pH 6.0에서 재조합 FcRn 단백질에 노출시켜 결합을 검출하였다. 포화 후, 바이오센서를 pH 6.0에서 벼파 단독에 노출시켜, 각각의 항체로부터 FcRn의 해리를 측정하였다. 그 결과는 항체의 온 속도 및 오프 속도를 나타내는 반응 곡선이다. 이들 속도는 ForteBio 소프트웨어를 사용하여 계산되었으며, 야생형 모타비주맙의 속도와 비교되었다. 야생형에 비해 온 속도의 증가 배수 및 오프 속도의 감소 배수는 표에 기재되어 있다. 많은 항체 돌연변이가 온 속도 및 오프 속도를 각각 유의하게 증가시키고 감소시켰다(도 11a). 또한, 6.0 내지 7.4의 pH 범위에서 대표적인 Fc 변이체의 FcRn에 대한 결합이 제시된다. FcRn에 대한 Fc 돌연변이체 항체의 친화도가 pH 6.0에서 개선되지만 pH 7.4와 같은 더 높은 pH에서는 유의하게 향상되지 않는 것이 중요하다. 도 11b는 이 대표적인 항체가 바람직한 특징인, pH 7.4에서 FcRn에 대한 불량한 결합을 계속 나타냄을 보여준다.

[0488] 도 11c는 항체 Fc의 CH2 도메인과 FcRn 분자의 상호작용을 도시한 것이다. 본원에서 설명되는 조작 노력은 형상상보성(SC), 정전하 상보성(CC) 및 소수성 상보성(HC)을 개선하기 위해 시도하였다. Fc 상의 몇몇 위치는 상호작용에 중요한 것으로 기록되어 있다. 250-나선도 언급되어 있다. 이 나선은 동적이며, 환경의 pH에 따라 움직인다. 이것은 pH 7.4에서가 아니라, pH 6.0에서 FcRn에 대한 Fc 도메인의 결합에서 중요하다.

[0489] 예시적인 Fc 변이체를 현상성 검정에서 시험하였고, 그 결과는 도 12에 요약되어 있다. 시프로 오렌지, SDS

PAGE 및 SEC-HPLC를 포함한 검정을 수행하였다. 발현 결정을 위해, 구축물을 제조자가 설명한 바와 같이 ExpiFectamine을 사용하여 96웰 배양 접시에서 Expi293 세포내로 형질감염시켰다. 5-7일 후, 모타비주맙 표준 곡선을 사용하여 항-인간 CH1 바이오센서가 장착된 생물층 간섭 측정기(Octet)를 사용하여 상청액을 정량하였다. 단백질 A 결합 평가를 위해, 다음을 수행하였다. 구축물을 제조자가 설명한 바와 같이 ExpiFectamine을 사용하여 30 mL 배양액에서 Expi293 세포내로 형질감염시켰다. 5-7일 후, 상청액을 수집하고, 항체를 정제하였다. 단백질 A 바이오센서가 장착된 생물층 간섭 측정기를 사용하여, 단백질 A에 대한 Fc 변형 항체 친화도를 측정하고, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 항체와 비교하였다.

[0490] 모타비주맙 항체와 관련하여 표현되는 모든 Fc 변이체는 환원 및 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 분리되었다. 간단히 설명하면, 5 μ L의 물 내의 2 μ g의 항체를 Laemmli 샘플 버퍼(BioRad 카탈로그 #161-0737) 및 β -메르캅토에탄올(BioRad 카탈로그 #161-0710)과 혼합하였다. 샘플을 95°C에서 10분 동안 끓인 다음, 짧은 시간 동안 원심분리하였다. 이어서, 샘플을 SeeBlue Plus2 분자량 표준물질(Invitrogen 카탈로그 #LC5925)과 함께 XCell1 SureLock 겔 전기영동 셀(Novex 카탈로그 #090403-839)에서 1x MES 이동 버퍼 내에서 4-12% Bis-Tris NuPAGE 겔(Thermo Scientific #NP0321BOX) 상에서 이동시켰다. 샘플을 200 V에서 35분 동안 이동시켰다. 겔을 제조사의 프로토콜에 따라 SimplyBlue SafeStain(Novex #LC6065)으로 염색하고, BioRad ChemiDoc MP 영상화 시스템으로 영상화하였다.

[0491] HPLC 기반 크기 배제 크로마토그래피(HPLC-SEC)는 단백질의 겉보기 크기, 단량체 순도, 및 실리카 기반 사이징(sizing) 수지와 단백질 사이의 겉보기 수준 비특이적 컬럼 흡착을 결정하기 위해 사용되는 분석 도구이다. IgG 용리 프로파일에 대한 Fc 돌연변이의 영향을 Phenomenex Biosep 3000s 컬럼에서 평가하였다. 간단히 설명하면, 다양한 Fc 변이체를 갖는 IgG를 pH 7.4의 PBS에 1 mg/ml 희석하고, 20 μ L를 컬럼에 주입하였다. 용리 시간 및 순도 비율을 기록하였다.

[0492] 모노클로날 항체의 열 안정성은 시차 주사 형광 측정법(DSF)에 의해 결정되었다. DSF는 증가하는 열 스트레스에 노출될 때 단백질의 입체형태적 안정성을 모니터링한다. 시프로 오렌지® 염료는 소수성 환경, 예를 들어 열에 의해 촉발된 단백질 언폴딩 또는 변성 동안 노출되는 소수성 코어 잔기에서 형광을 나타낸다. 형광 신호를 모니터링함으로써, CH2, CH3 및 Fab의 언폴딩을 모니터링할 수 있다. 모타비주맙 Fab를 갖는 다양한 Fc 변이체를 시프로 오렌지 검정에서 평가하였다. 간단히 설명하면, 15 μ L의 0.5 mg/ml의 IgG를 1:500으로 희석된 15 μ L의 시프로 오렌지 염료와 혼합하고, 40°C로부터 99°C까지 1°C 램프(ramp)를 사용하여 형광 판독 기능을 갖는 열 순환기에 의해 평가하였다. 천연 상태와 제1 언폴딩 이벤트 사이의 중간점은 전이 온도 또는 융점(T_m)으로 보고되었다.

[0493] 모든 Fc 돌연변이를 IgG1(m3 동종이인자형(allotype)) 중쇄 유전자에 도입하고, pcDNA3.1(C)에 클로닝하였다. 경쇄 유전자를 pcDNA3.1(A)에 클로닝하였다. 모든 경우에, 천연 신호 웨티드는 오스테오닉틴 신호 웨티드(GenBank 수탁 # AAA60993)로 대체되었다. 제조사의 프로토콜에 따라 Expi293 형질감염 키트(Thermo Fisher 카탈로그 # A14524)를 사용하여 Expi293 세포에서의 일시적인 형질감염에 의해 중쇄 및 경쇄 벡터의 동시 발현을 수행하였다. 중쇄 및 경쇄 벡터를 1:2의 비율로 동시에 형질감염시켰다. 세포 배양 상청액을 형질감염 후 5일에서 7일 사이에 수거하고, 제조사의 지시에 따라 HiTrap MabSelect SuRe 단백질 A 컬럼(GE)을 사용하여 AKTA 10 FPLC 시스템(GE)에서 정제하였다.

[0494] AKTA 정제기 10 FPLC 시스템을 사용하여 mAb select sure 단백질 A 수지(GE 카탈로그 # 17543801)가 충전된 1 mL 컬럼을 사용하여 모든 항체를 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 간단히 설명하면, 멸균 여과된 세포 배양 상청액을 2 mL/분의 유속으로 컬럼에 로딩하였다. 컬럼을 10 컬럼 부피의 PBSN(0.05% 아지드화나트륨을 갖는 1x PBS)로 세척하였다. 항체를 10 컬럼 부피의 용리 버퍼(100 mM 글리신 pH 2.5)으로 용리시키고, 17.5% v/v의 중화 버퍼(1M 트리스, 1M NaCl, pH 8.0)을 첨가하여 중화하고, 1 mL 분획으로 분석하였다. 280 nm에서의 흡광도에 대한 크로마토그램을 사용하여 항체를 함유하는 용리 분획을 확인하였다. 이어서, 모든 항체를 10,000 달톤 분자량 컷오프 카세트(Thermo Fisher 카탈로그 # 66380)를 사용하여 1x PBS 내에 투석하였다.

[0495] 단백질 A 결합은 단백질 A 컬럼을 사용하여 FPLC에 의해 정제되는 모든 항체의 능력에 의해 기능적으로 결정되었다. 정제 후, 옥텟 데이터 수집 소프트웨어와 함께 제공되는 표준 정량 프로토콜에 따라 옥텟 QK^e 시스템 및 단백질 A 바이오센서(Pall 카탈로그 # 18-5012)를 사용하여 알려진 양의 항체를 정량하여 단백질 A 결합을 추가로 평가하였다.

[0496] Expi293 세포를 C-말단 상에 6x 히스티딘 태그를 갖는 인간 α -FcRn을 코딩하는 플라스미드 및 인간 β 2M을 코딩하는 플라스미드로 동시에 형질감염시켰다. 세포 배양 상청액을 형질감염 4일 후에 수거하였다. HisTrap HP 컬

럼(GE 카탈로그 # 17-5247-01)이 구비된 AKTA 순수 FPLC 시스템을 사용하여 세포 배양 상청액으로부터 FcRn을 정제하였다. 정제 후, 단백질을 1x PBS(pH 6.0) 내에 투석하였다.

[0497] 옥텟 QK^e 시스템에서 항-CH1 Fab 바이오센서를 사용하여 스크리닝 검정을 수행하였다. 간단히 설명하면, 10 µg/mL의 정제된 IgG를 항-CH1 바이오센서 상에 180 초 동안 로딩하였다. 1x PBS(pH 6.0)에서 60초의 기준선 단계 후에, IgG가 로딩된 텁을 60초 동안 50 µg/mL의 농도로 FcRn에 노출시킨 다음, PBS(pH 6.0)에서 60초 동안 해리시키고, PBS(pH 7.4)에서 추가로 30초 동안 해리시켰다. 또한, FcRn 결합은 NiNTA 바이오센서를 사용하여 수행되었다. 간단히 설명하면, 5 µg/mL의 재조합 인간 FcRn을 NiNTA 바이오센서 상에 180초 동안 로딩하였다. 1x PBS(pH 6.0)에서 60초의 기준선 단계 후에, FcRn이 로딩된 텁을 60초 동안 250 nM(37.5 µg/mL)의 농도로 IgG에 노출시킨 다음, PBS(pH 6.0)에서 60초 동안 해리시키고, PBS(pH 7.4)에서 추가로 30초 동안 해리시켰다. 각각의 검정의 검정 완료 후, pH 6.0에서 친화도 상수(K_D)의 정량적 평가를 ForteBio 옥텟 소프트웨어를 사용하여 수행하고, 정성적 평가는 시간 경과에 따른 반응 속도를 플로팅하여, pH 6.0에서의 FcRn에 대한 IgG의 결합 및 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 후속 해리를 가시화함으로써 수행된다.

[0498] 도 12에 도시된 바와 같이, 모든 Fc 변이체는 이를 실험 모두에서 WT 항체와 대등하게 수행되었다.

실시예 8: 조작된 항체의 반감기 및 약동학적 분석의 생체내 평가

[0500] 모타비주맙 야생형을 조작된 항체 반감기의 생체내 평가에서 Fc 조작 돌연변이 중 3개를 포함하는 모타비주맙과 비교하였다. 항체(2-5 mg/kg)를 인간 FcRn에 대한 유전자 이식된 마우스에게 투여하고, 마우스 혈청의 샘플을 매일 수득하였다(제0일 내지 제4일). ELISA를 혈청에 대해 수행하여 혈청 내의 모타비주맙의 양을 정량하였다.

[0501] 마우스 혈청에 존재하는 인간 IgG의 양은 제조사의 프로토콜에 따라 인간 IgG 정량 ELISA 키트(Bethyl Labs 카탈로그 # E80-104)를 사용하여 결정하였다. 모든 혈청 샘플을 1:50의 희석 비율에서 시작하여 1:6400의 희석 비율로 끝나는 2배 연속 희석법으로 적정하였다. 각각의 ELISA 플레이트는 키트와 함께 2개 또는 3개로 제공된 인간 참조 표준 곡선을 포함하였다. 표준 곡선은 다음 농도를 함유한다: 500.0, 250.0, 125.0, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 및 3.9 ng/mL. 검출 하한은 참조 표준에서 제2 지점에서 마지막 지점에 대해 얻은 A450 nm 값인 것으로 간주되었으며, 이것은 7.8 ng/mL이었다. 혈청의 시작 희석 비율이 1:50이었기 때문에, 검정의 검출 수준은 0.4 µg/mL(7.812 ng/mL x 50배 희석)이다. IgG 수준을 계산하기 위해 다음 절차가 수행되었다: (1) 표준 곡선에서 4개 파라미터 로지스틱 희귀 분석(4PL)을 수행하고; (2) 허용 가능한 최대 A450 nm 신호를 표준 곡선에서 제3 적정 지점에 대한 판독값으로 설정하고; (3) 허용 가능한 최소 A450 nm 신호를 표준 곡선에서 제7 적정 지점에 대한 판독값으로 설정하고; (4) 허용 가능한 최대 신호를 초과하고 허용 가능한 최소 신호 미만인 모든 샘플 적정 지점을 차단하고; (5) 허용 가능한 A450 신호를 갖는 각각의 적정 지점에 대해 농도를 계산하고 계산된 값에 해당 적정 지점의 희석 배율을 곱하기 위해 참조 표준 4PL 곡선 피트를 사용하고; (6) 각각의 샘플 적정에 대해, 적정 계열에 걸쳐 계산된 농도의 평균값을 계산한다.

[0502] ELISA 결과는 100%를 나타내는 제0일 시점을 기준으로 잔류하는 항체의 백분율로 전환되었다. 도 13a-13b에 도시된 바와 같이, 3개의 항체 변이체는 모두 상기 항체 반감기의 잘 확립된 마우스 모델에서 연장된 반감기를 나타내었다. 모타비주맙 야생형의 반감기는 32시간이다. FcMut008 상에 구축된 FcMut043 및 FcMut045 돌연변이체는 유의한 반감기 개선을 제시한다. FcMut045 돌연변이체는 반감기를 5.2배 향상시켰다(약 166시간의 반감기). 도 13b에서 반감기 및 다른 파라미터는 모두 Winonlin 소프트웨어를 사용하여 계산되었다.

[0503] 유사한 실험을 모타비주맙과 관련하여 보다 후기의 Fc 변이체를 사용하여 수행하였다. 모타비주맙 변이체를 5 mg/kg의 투여량으로 투여한 경우, 차세대 변이체(FcMut171, FcMut183, FcMut186 및 FcMut179)는 더욱 향상된 반감기를 나타내었고, FcMut213에서는 9배 초과의 반감기 증가가 관찰되었다(도 14a-14b). 초기 변이체(FcMut045) 중 하나는 초기 단계 설계와 비교하여 후기 단계 설계에서 관찰된 개선된 반감기를 입증하기 위해 포함되었다. 모타비주맙 변이체를 2 mg/kg의 투여량으로 투여한 경우에도 유사한 결과가 관찰되었다(도 14c-14d).

[0504] 인간 FcRn에 대한 Fc 변이체의 향상된 결합이 혈청 지속성 증가 및 보다 긴 순환 반감기로 해석되는지 평가하기 위해, 상이한 Fc 변이체를 함유하는 IgG의 약동학 연구를 Tg276 트랜스제닉 마우스에서 수행하였다. 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 모델은 인간 Fc 함유 생물치료제의 PK를 연구하기 위해 잭슨 래보러토리(Jackson Laboratory)(JAX)에 의해 개발되었다. Tg276 마우스는 마우스 FcRn 알파 사슬이 결핍되고, 구성적인 프로모터(액틴)의 제어 하에 인간 FcRn 알파 도입유전자를 발현하고, 마우스 β2 마이크로글로불린을 사용한다. Tg276 동형접합 또는 반접합 마우스는 항체 변이체의 반감기를 구분하기 위해 널리 사용되었다.

- [0505] 생체내 연구를 위해, Tg276hemi FcRn 트랜스제닉 마우스에게 2 또는 5 mg/kg의 mAb를 정맥 내로 투여하였다. 각각의 mAb 군은 군당 4마리의 마우스로 이루어졌다. 혈액을 1시간 내지 21일 사이의 여러 시점에서 수거하고, IgG 역가를 본원에서 설명되는 바와 같은 정량적 ELISA에 의해 결정하였다. PK 파라미터는 Phoenix WinNonlin 버전 7.0(Certera)을 사용하여 비구획 모델을 갖는 마우스의 각각의 군에 대해 결정되었다.
- [0506] 그 결과를 도 14a-14d에 도시한다.
- [0507] 실시예 9: 조작된 항체의 생체내 반감기 평가
- [0508] 야생형 모타비주맙(MVZ)뿐만 아니라 2개의 지카 항체(ZVA 및 ZVB)를 2-5 mg/kg의 투여량으로 인간 FcRn에 대한 유전자 이식된 마우스에게 투여하고, 마우스 혈청의 샘플을 매일 수득하였다(제0일 내지 제4일). ELISA를 혈청에 대해 수행하여 모타비주맙의 양을 정량하였다. ELISA 결과는 100%를 나타내는 제0일 시점을 기준으로 잔류하는 항체의 백분율로 전환되었다. ZVA 항체는 A 시리즈 항체 A-3/2를 나타낸다. ZVB 항체는 친화도 향상 경쇄 변형 S92Y를 함유하는 A 시리즈 항체 A-5/1을 나타낸다. 도 15에 도시된 바와 같이, ZVB는 모타비주맙 또는 ZVA(ZVA 및 ZVB 둘 모두 모타비주맙보다 긴 반감기를 가짐)보다 훨씬 더 긴 반감기를 가졌다. 이를 항체는 야생형 Fc 영역을 포함하였고, 따라서 ZVB 항체의 연장된 반감기는 임의의 Fc 조작이 아니라 항체 자체의 특성이다.
- [0509] 다음 실험에서, 모타비주맙 야생형(MVZ WT)을 ZVB 항체(ZB-1/4, 그래프에서 ZKB) 및 Fc 변형 156을 포함하는 ZVB 항체(L234A/L235A("LALA") 및 T256D/T307R/Q311V(반감기 연장), 그래프의 ZKB-156), 및 "LS" 반감기 Fc 돌연변이(ZKB-LS)에 대해 시험하였다. LS 및 Fc 변형 156 둘 모두 야생형 ZVB와 비교하여 유의하게 연장된 반감기를 갖는다(도 16). 이 데이터는 비스테라 돌연변이가 문헌에서 유도된 LS 돌연변이와 대등하다는 것을 입증하며, 또한 본원에서 설명되는 FC 조작 노력이 이미 상기 트랜스제닉 마우스 모델에서 매우 긴 반감기를 갖는 항체의 반감기를 연장시킬 수 있음을 입증한다. "ZVB"는 도 16에서 "ZKB"로 표시된다.
- [0510] 실시예 10: Fc 수용체에 대한 결합 및 이펙터 기능에 미치는 영향
- [0511] 예시적인 Fc 변이체는 Fc γ RI, Fc γ RIIA(흡소닌 쇠세포 작용(opsonophagocytosis)의 매개체), Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA(ADCC의 매개체) 및 C1q(CDC의 매개체)에 대한 다중 검정으로 평가하였다.
- [0512] Fc γ 수용체 I, IIa, IIb, IIIa 및 IIIa V176F(R&D Systems 카탈로그 # 1257-FC-050, 1330-CD-050, 1875-CD-050, 4325-FC-050 및 8894-FC-050)에 대한 결합을 ELISA로 측정하였다. 모든 Fc 변이체는 모타비주맙, 리툭시맙 또는 약톡수맙 항체와 관련하여 시험되었다. 간단히 설명하면, Fc 수용체는 PBS 내의 1 µg/mL(0.1 µg/웰)로 ELISA 플레이트(VWR 카탈로그 # 62409-002)에 코팅하고, 4°C에서 밤새 보관하였다. 플레이트를 PBST(1x PBS 0.05% Tween20)로 3회 세척하였다. 항체를 100 µg/mL로부터 0.05 µg/mL로 PBST-BSA 내에서 3배 적정하고, 100 µL를 ELISA 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 염소 항-인간 Fc(Jackson 카탈로그 # 109-035-098)를 PBST-BSA 내에 1:5000으로 희석하고, 100 µL를 각각의 웰에 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 6회 세척하였다. TMB 마이크로웰 퍼옥시다제 기질 키트(VWR 카탈로그 # 95059-156)를 사용하여 플레이트를 발색시켰다. 1N 황산을 첨가하여 10분 후에 반응을 중지시키고, 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 항체 농도(x-축) 및 450 nm에서의 흡광도(y-축)의 값을 4개 파라미터 로지스틱 회귀 분석(4PL) 곡선에 피팅하였다. 이어서, 곡선 피트를 사용하여 각각의 Fc 변이체의 EC50(4PL의 중간점)을 결정하였다.
- [0513] Fc γ 수용체 IIa 및 IIb에 대한 결합은 옥텟 QKe 시스템을 사용하여 생물층 간섭 측정에 의해 측정되었다. 간단히 설명하면, Fc γ IIa 및 Fc γ IIb(R&D Systems 카탈로그 # 1330-CD-050 및 1875-CD-050)를 PBS 내에 5 µg/mL로 희석하였다. 수용체를 C-말단 6x 히스티딘 태그(서열 번호 2)를 통해 Ni-NTA 바이오센서(Pall 카탈로그 # 18-5101)에 180초 동안 고정한 후, PBS 내에서 60초의 기준선 단계를 수행하였다. 이어서, 바이오센서를 120초 동안 PBS 내에 50 µg/mL의 농도로 다양한 Fc 변이체에 노출한 후, PBS에서 추가로 120초 동안 해리 단계를 수행하였다. 각각의 변이체에 대한 결합 단계 동안 최대 결합 반응을 보고하고, 야생형 Fc 반응과 비교하였다.
- [0514] C1q에 대한 결합을 ELISA에 의해 측정하였다. 모든 Fc 변이체는 모타비주맙 항체와 관련하여 시험하였다. 간단히 설명하면, 항체를 PBS 내의 25 µg/mL(2.5 µg/웰)로 ELISA 플레이트(VWR 카탈로그 # 62409-002)에 코팅하고, 4°C에서 밤새 보관하였다. 플레이트를 PBST(1x PBS 0.05% Tween20)로 3회 세척하였다. 정제된 C1q(Quidel Corporation 카탈로그 # A400)를 12.5 µg/mL로부터 0.02 µg/mL로 PBST-BSA(1x PBS 0.05% Tween20 1% BSA) 내에서 3배 적정하고, 실온에서 90분 동안 인큐베이팅하였다. 액체는 웰로부터 흡인 제거하고, 폴리클로날 토키 항-인간 C1q(Agilent 카탈로그 # A013602-1)를 PBST-BSA 내에 최종 농도 1 µg/mL로 희석하고, 각각의 웰에 100 µL를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 폴리클로날 돼지 항-

토끼-HRP(Agilent 카탈로그 # P021702-2)를 PBST-BSA 내에 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하고, 각각의 웰에 100 μl 를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 6회 세척하였다. TMB 마이크로웰 퍼옥시다제 기질 키트(VWR 카탈로그 # 95059-156)를 사용하여 플레이트를 발색시켰다. 1N 황산을 첨가하여 10분 후에 반응을 중지시키고, 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 항체 농도(x-축) 및 450 nm에서의 흡광도(y-축)의 값을 4개 파라미터 로지스틱 회귀 분석(4PL) 곡선에 피팅하였다. 이어서, 곡선 피트를 사용하여 각각의 Fc 변이체의 EC50(4PL의 중간점)을 결정하였다.

[0515] 그 결과를 도 17a-17d에 도시한다.

[0516] 실시예 11: 조작된 항체의 CDC 활성

[0517] 예시적인 Fc 변이체(리툭시맙 Fab)의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 조사하였다.

[0518] CDC 검정은 CD20+ Raji 세포 및 저독성 기니피그 보체(Cedarlane Laboratories Product # CL4051)를 사용하여 수행하였다. 보체 유도 세포 용해는 제조자의 프로토콜에 따라 프로메가(Promega)의 CYTOTOX 96® 비방사성 세포독성 검정(카탈로그 # G1780)을 사용하여 측정하였다. 모든 Fc 변이체는 항-CD20 항체인 리툭시맙과 관련하여 시험하였다. 간단히 설명하면, 항체 농도를 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로부터 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 4배 적정하고, 30분 동안 37°C에서 웨들당 20,000개의 표적 세포와 함께 인큐베이팅하였다. 이어서, 보체를 세포에 첨가하고, 37°C에서 2시간 더 인큐베이팅하였다. 또한, CYTOTOX 키트와 함께 제공된 세포 용해 버퍼를 대조군 웰에 첨가하여 최대 세포 용해를 측정하였다. 음성 대조군 항체인 모타비주맙은 무관한 항체의 배경 신호를 측정하기 위해 사용되었다. 배경 신호 및 최대 용해 신호를 사용하여 각각의 Fc 변이체에 대해 세포 용해의 백분율을 계산하였다. 항체 농도(x-축) 및 용해 백분율(y-축)의 값을 4개 파라미터 로지스틱 회귀 분석(4PL) 곡선에 피팅하였다. 이어서, 곡선 피트를 사용하여 각각의 Fc 변이체의 EC50(50% 용해를 얻는데 필요한 농도) 및 최대 용해를 결정하였다.

[0519] 그 결과를 도 18에 도시한다.

[0520] 실시예 12: 조작된 항체의 ADCC 활성

[0521] 예시적인 Fc 변이체(리툭시맙 Fab)의 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 조사하였다.

[0522] ADCC 검정은 제조자의 프로토콜에 따라 프로메가의 CD20⁺ WIL2-S 표적 세포를 사용한 ADCC 리포터 생물검정(Reporter Bioassay)(카탈로그 # G7014)을 사용하여 수행되었다. 모든 Fc 변이체는 항-CD20 항체인 리툭시맙과 관련하여 시험하였다. 항체 농도를 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로부터 0.0016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 5배 적정하였다. 항체 농도(x-축) 및 발광리포터 유전자의 유도 배수(y-축)의 값을 4개 파라미터 로지스틱 회귀 분석(4PL) 곡선에 피팅하였다. 이어서, 곡선 피트를 사용하여 각각의 Fc 변이체의 EC50(4PL의 중간점) 및 최대 유도를 결정하였다.

[0523] 그 결과를 도 19a-19b에 도시한다. 예시적인 Fc 변이체는 ADCC 활성을 보유하고, 일부 경우에는 상기 활성을 향상시킨다.

[0524] 실시예 13: 조작된 항체의 ADIN 활성

[0525] TRIM21은 IgG의 Fc와 결합하는 시토졸 수용체이다. TRIM21은 Fc 결합 바이러스의 세포내 인식 및 중화를 매개하는데 역할을 한다. TRIM21 매개 중화는 항체 의존성 세포내 중화(ADIN)로 알려져 있다.

[0526] TRIM21에 대한 결합은 ELISA에 의해 측정되었다. 모든 Fc 변이체는 모타비주맙 또는 악톡수맙 항체와 관련하여 시험하였다. 간단히 설명하면, 항체를 PBS 내의 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.5 $\mu\text{g}/\text{웰}$)로 ELISA 플레이트(VWR 카탈로그 # 62409-002)에 코팅하고, 4°C에서 밤새 보관하였다. 플레이트를 PBST(1x PBS 0.05% Tween20)로 3회 세척하였다. TRIM21-GST(Antibodies Online 카탈로그 # ABIN1323621)를 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로부터 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 PBST-BSA(1x PBS 0.05% Tween20 1% BSA) 내에서 3배 적정하고, 실온에서 90분 동안 인큐베이팅하였다. 액체는 웰로부터 흡인 제거하고, 2개의 토끼 항-항 TRIM21 항체(AbCam 카탈로그 # ab91423 및 ab96800)는 각각 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 PBST-BSA 내에서 함께 혼합하고, 각각의 웰에 100 μl 를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 폴리클로날 돼지 항-토끼-HRP(Agilent 카탈로그 # P021702-2)를 PBST-BSA 내에 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하고, 각각의 웰에 100 μl 를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 6회 세척하였다. TMB 마이크로웰 퍼옥시다제 기질 키트(VWR 카탈로그 # 95059-156)를 사용하여 플레이트를 발색시켰다. 1N 황산을 첨가하여 10분 후에 반응을 중지시키고, 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 항체 농도(x-축) 및 450 nm에서의 흡광도(y-축)의 값을 4개 파라미터 로지스틱 회귀 분석(4PL) 곡선에 피팅하였다. 이어서, 곡선 피트를 사용하여 각각의 Fc 변이체의 EC50(4PL의 중간점)을 결정하였다.

[0527] Fc 변이체가 TRIM21에 대한 결합에 영향을 주는지 평가하기 위해 TRIM21 결합 ELISA를 수행하였다. 그 결과를 도 26에 도시한다. Fc 변이체 FcMut045, FcMut183, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228은 WT EC50의 1.5 배 이내인 TRIM21 결합 EC50을 나타내었다.

[0528] 실시예 14: Fc 돌연변이에 의한 점막 흡수의 증진

[0529] FcRn은 장 및 폐포 표면을 감싸는 점막 상피와 같은 상이한 세포 장벽을 가로질러 IgG를 운반한다. FcRn 결합의 변형은 면역 보호를 부여하는 점막 국소화를 향상시키는 메커니즘을 제공한다. 예시적인 Fc 돌연변이체는 유사한 방식으로 점막 흡수를 증가시킬 것으로 예상된다.

[0530] 실시예 15: FcRn 친화도 향상 돌연변이의 Fc 수용체 결합 및 이펙터 기능에 대한 영향

[0531] Fc의 다른 수용체에 대한 결합에 대한 FcRn 친화도 향상 돌연변이의 영향을 실험에 의해 평가하였다. IgG의 Fc 영역은 많은 상이한 Fc 수용체에 결합할 수 있고, 많은 치료용 항체에 대한 작용 메커니즘은 Fc 수용체와의 결합에 의존한다. 돌연변돌연변이는 Fc 수용체 결합 부위로부터 먼 위치에서도 Fc의 Fc γ RI, Fc γ RIIa/b, Fc γ RIIIa, C1q, TRIM21과 같은 수용체에 대한 결합에 영향을 미칠 수 있다. Fc 수용체 TRIM21은 CH2-CH3 상의 FcRn 결합 부위와 중첩되는 부위에 결합하는 반면, Fc γ 수용체 및 C1q와 같은 다른 수용체는 이량체 CH2에 의해 형성된 계면에서 결합한다. 따라서, 반감기를 향상시키기 위해 도입된 임의의 돌연변이는 다른 수용체에 대한 결합에 미치는 그의 영향에 대해 평가되어야 한다. 반감기를 향상시키기 위해 도입된 돌연변이는 일 수 있다. Fc 변이체(FcMut183, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228, FcMut229, YTE, LS)를 리툭시맙 Fab에 통합시키고, WT 리툭시맙과 함께 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, FccyRIIIa, C1q 및 TRIM21에 대한 결합을 평가하였다. 도 24에 도시된 바와 같이, Fc 변이체 FcMut183, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228 및 FcMut229의 도입은 시험된 Fc 수용체에 대한 결합에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0532] Fc 수용체에 대한 결합은 ADCC(Fc γ RIIIa), CDC(C1q) 및 ADIN(TRIM21)과 같은 활성을 필수적이지만, 이러한 활성을 매개하는데 충분하지 않을 수 있다. 예를 들어, Fc의 유향체 조립체는 CDC 활성을 유도하기 위해 필요하다. Fc 유향체 조립체는 Fc-Fc 계면의 형성을 수반하고, 이 계면의 형성에 관여하는 잔기는 FcRn 결합 부위와 부분적으로 중첩된다. 따라서, Fc 수용체에 대한 결합뿐만 아니라 CDC 및 ADCC와 같은 활성에 대한 Fc 돌연변이의 영향을 평가하는 것이 중요하였다. 다양한 Fc 변이체(FcMut183, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228, FcMut229, YTE, LS, WT)를 갖는 리툭시맙은 방법 섹션에 기재된 바와 같이 ADCC 및 CDC 활성에 대해 평가하였다. 그 결과, Fc 변이체 FcMut183, FcMut197, FcMut213, FcMut215, FcMut228 및 FcMut229는 ADCC 활성에 부정적인 영향을 주지 않았고, 사실상 CDC 활성의 경미한 향상을 나타내었다. YTE를 함유하는 리툭시맙은 검출 가능한 CDC 활성을 보이지 않고 ADCC 활성을 유의하게 감소시켰다. 이와 유사하게, 또 다른 돌연변이체 FcMut197은 감소된 ADCC 및 CDC 활성을 나타내었다. 이러한 돌연변이에 대한 네트워크 지도의 조사는 ADCC 및 CDC 활성 상실의 가능한 이유에 대한 통찰력을 제공한다.

[0533] 실시예 16: 트랜스제닉 마우스의 혈청에서 최적화된 Fc 변이체의 지속성

[0534] 인간 FcRn에 대한 Fc 변이체의 향상된 결합이 혈청 지속성 증가 및 보다 긴 순환 반감기로 해석되는지 평가하기 위해, 상이한 Fc 변이체를 함유하는 IgG의 약동학 연구를 Tg276 트랜스제닉 마우스에서 수행하였다. 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 모델은 인간 Fc 함유 생물치료제의 PK를 연구하기 위해 사용될 수 있다 (Roopenian *et al.*, *Methods Mol Biol*, 2010. 602: 93-104; Petkova *et al.*, *Int Immunopharmacol*, 2006. 18(12): 1759-69). Tg276 마우스는 마우스 FcRn 알파 사슬이 결핍되고, 구성적인 프로모터(액틴)의 제어 하에 인간 FcRn 알파 도입유전자를 발현하고, 마우스 β 2 마이크로글로불린을 사용한다. Tg276 동형접합 또는 반접합 마우스는 항체 변이체의 반감기를 구분하기 위해 사용될 수 있다. PK 연구를 위해, Tg276hemi FcRn 트랜스제닉 마우스에게 5 mg/kg의 IgG(WT 또는 변형된 Fc 상의 모타비주맙 Fab)를 정맥 내로 투여하였다. 후안와 혈액 수집(Retro-orbital blood collection)을 여러 시점에서 수행하고, IgG 역가를 정량적 ELISA에 의해 결정하였다. 조작된 Fc 변이체를 함유하는 IgG는 야생형 모타비주맙보다 훨씬 더 오랫동안 혈청에서 지속되었다(도 25a). 비구획 분석으로부터의 약동학적 파라미터는 Fc 변이체를 갖는 모타비주맙이 2배 초과로 더 느린 제거율 및 β -상 제거 반감기 및 곡선 하 면적(AUC) 측정에서의 현저한 증가를 제시함을 나타낸다(도 25b).

[0535] 참조에 의한 인용

[0536] 본원에서 언급되는 모든 출판물, 특히, 및 수탁 번호는 마치 각각의 개별 출판물 또는 특허가 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 나타낸 것처럼, 그 전체가 본원에 참고에 포함된다.

[0537]

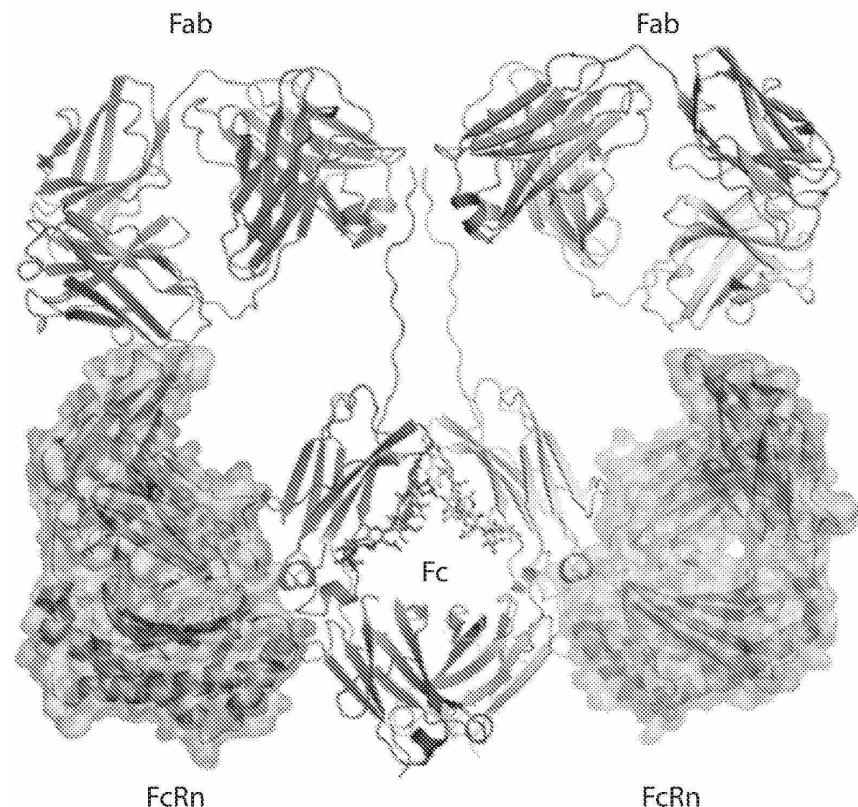
균등 내용

[0538]

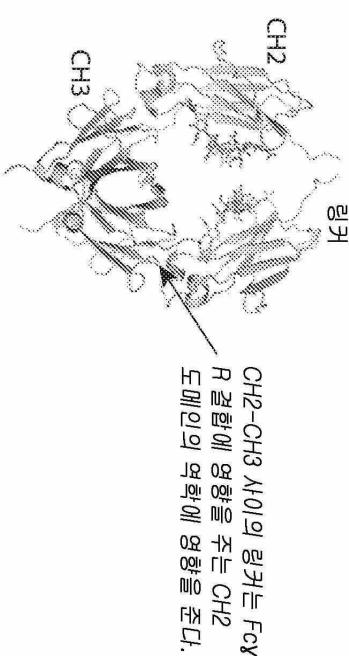
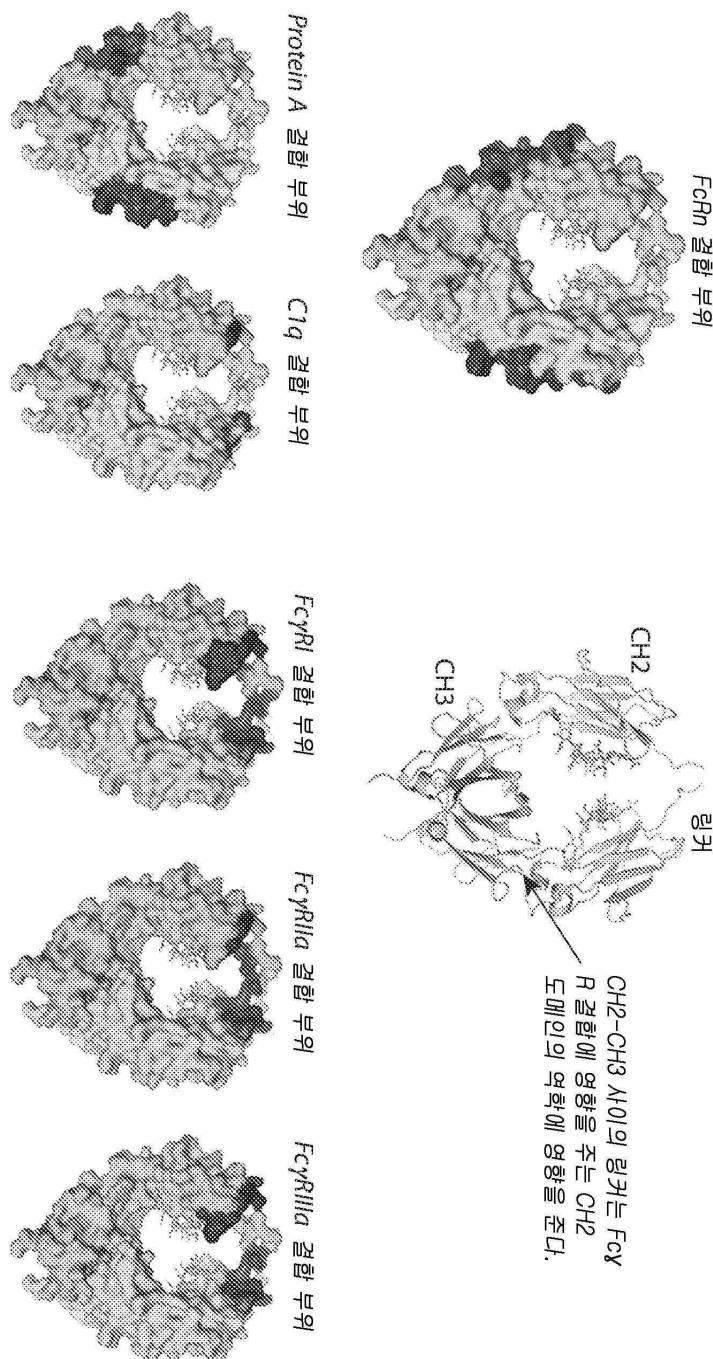
본 발명의 구체적인 실시양태가 논의되었지만, 상기 명세서는 예시적인 것으로서, 한정적인 것이 아니다. 본 발명의 많은 변형은 본 명세서 및 하기 청구범위를 검토함으로써 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 균등 내용의 전체 범위와 함께 청구범위, 및 상기 변형과 함께 명세서를 참고로 하여 결정되어야 한다.

도면

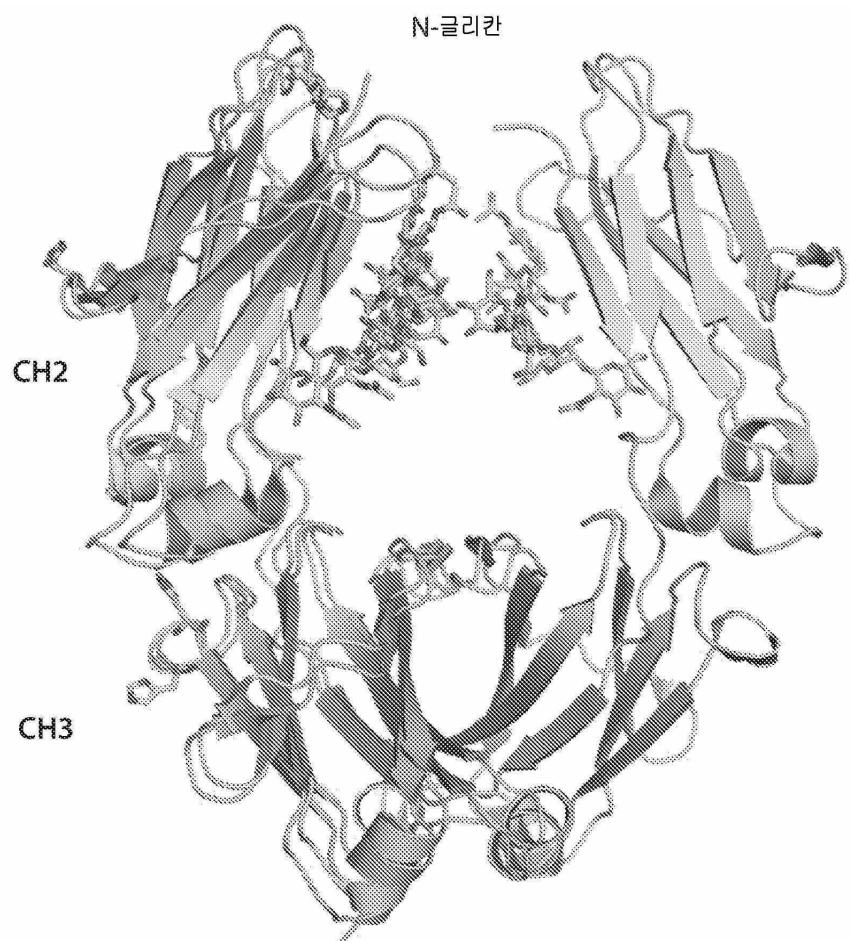
도면1



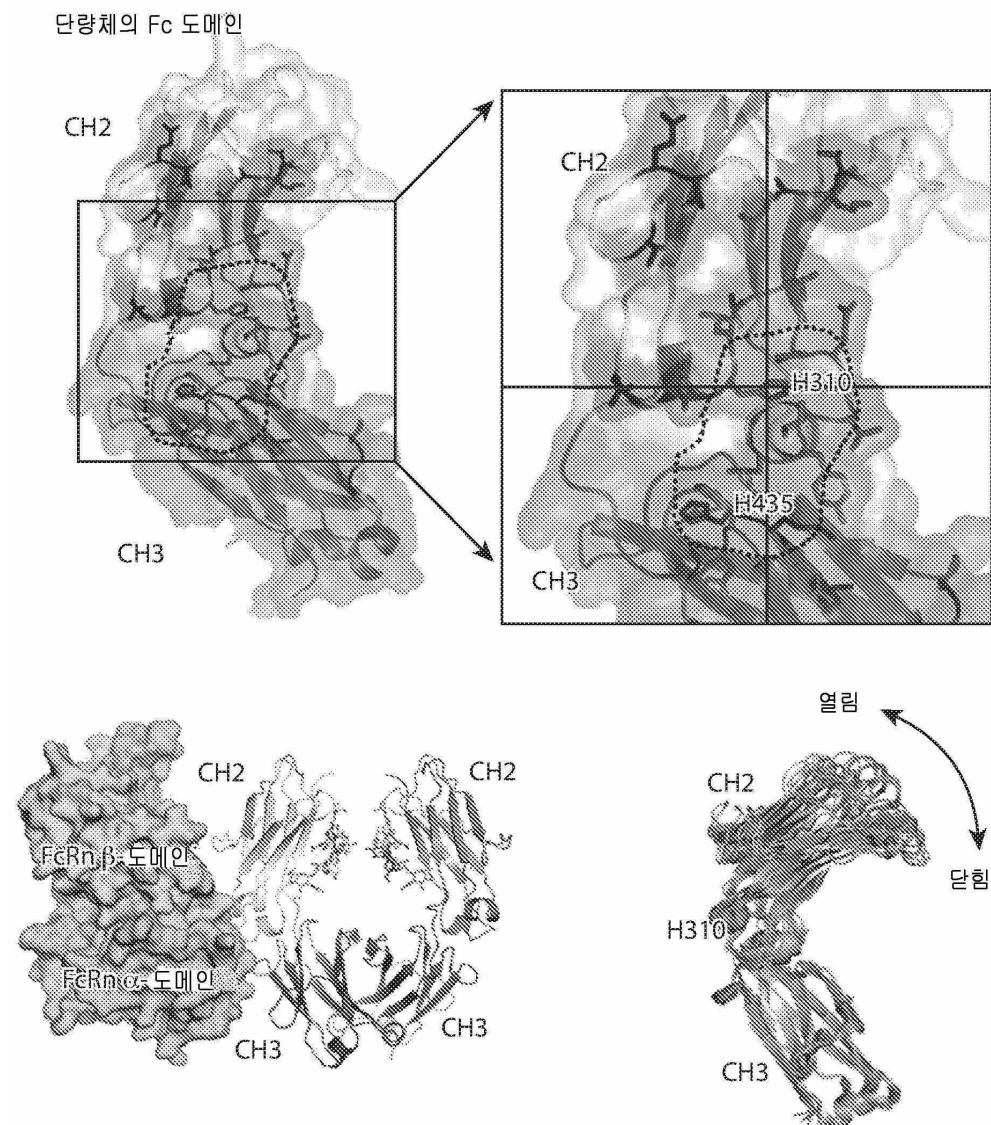
도면2



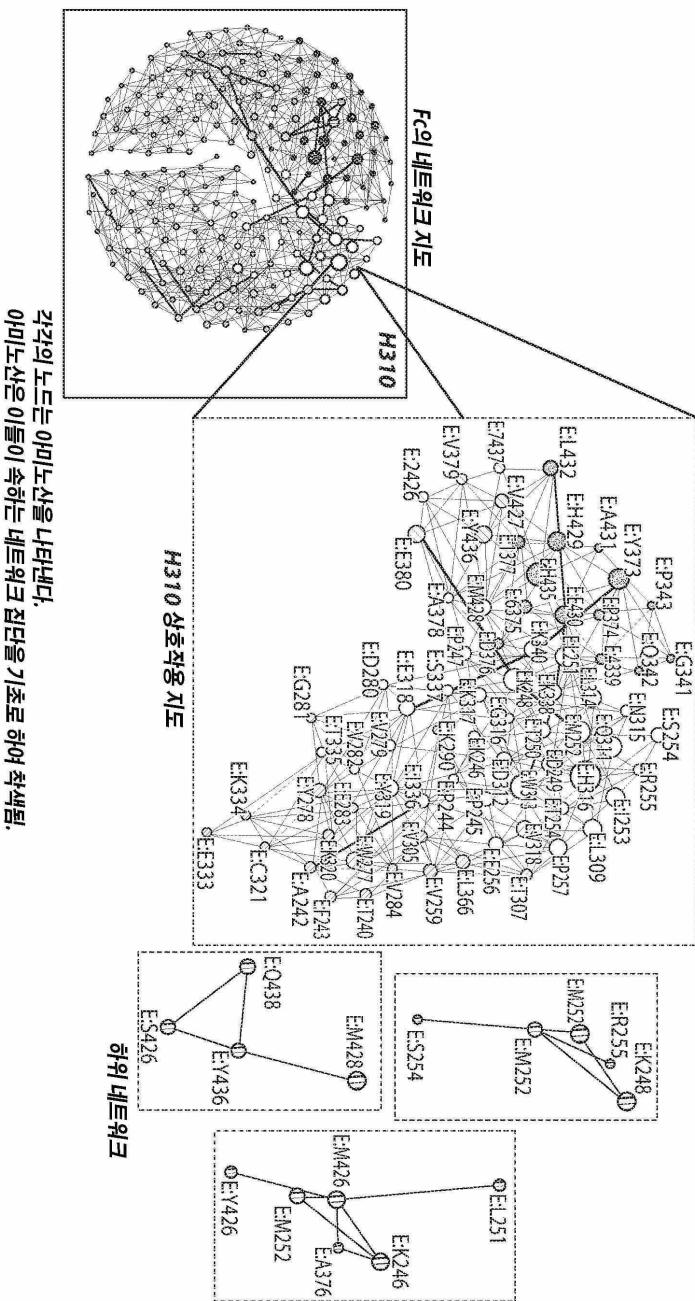
도면3



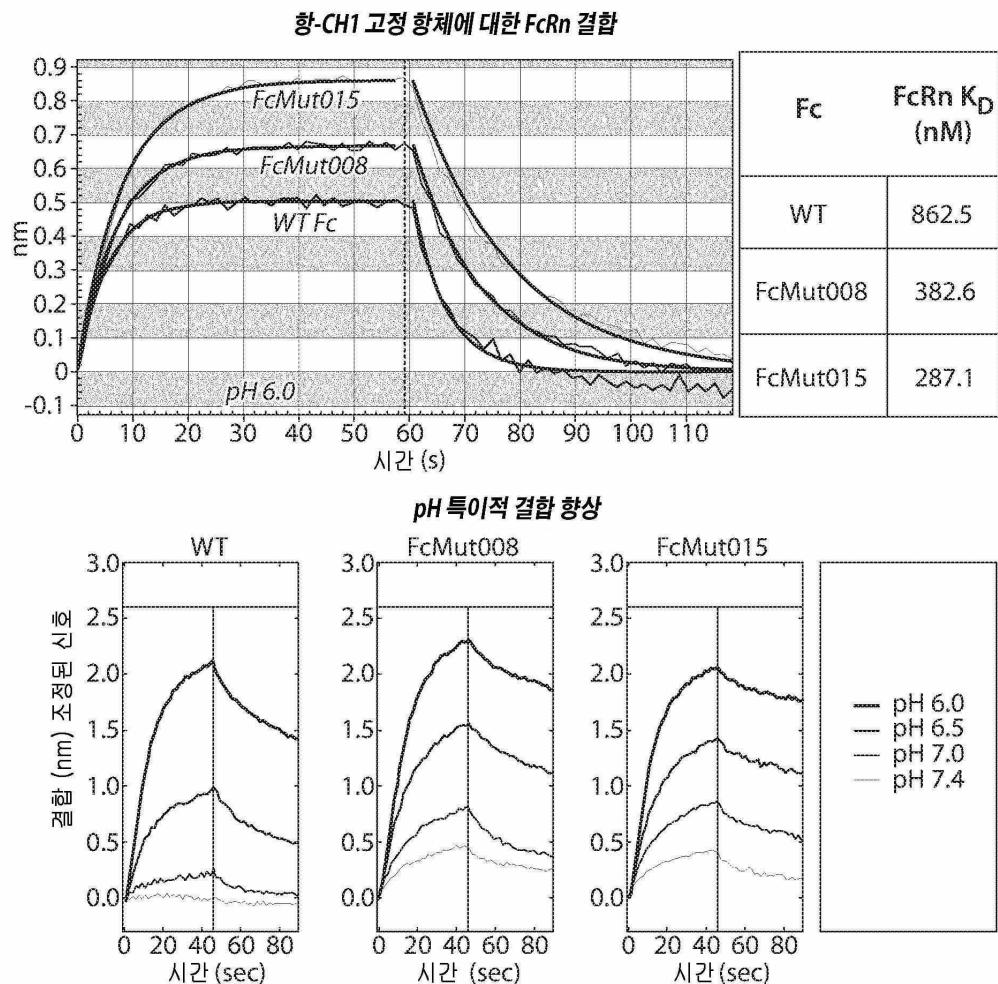
도면4



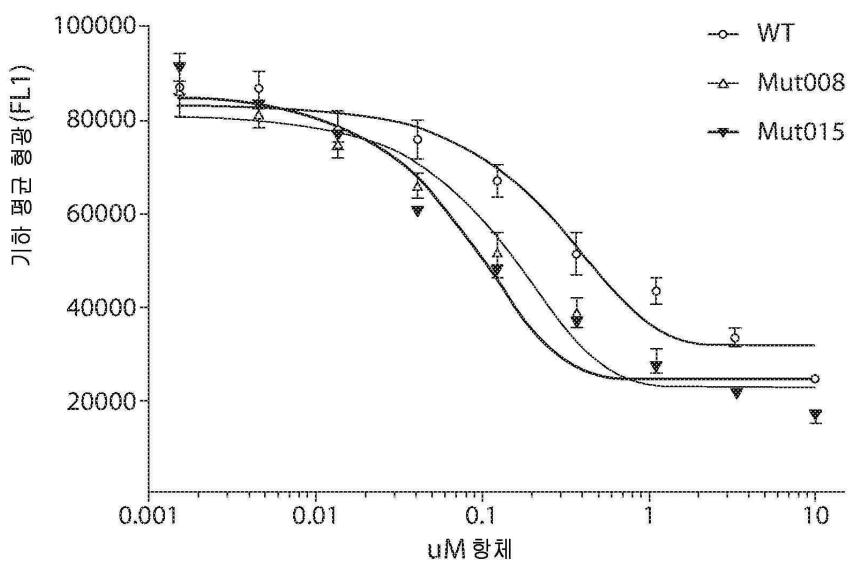
도면5



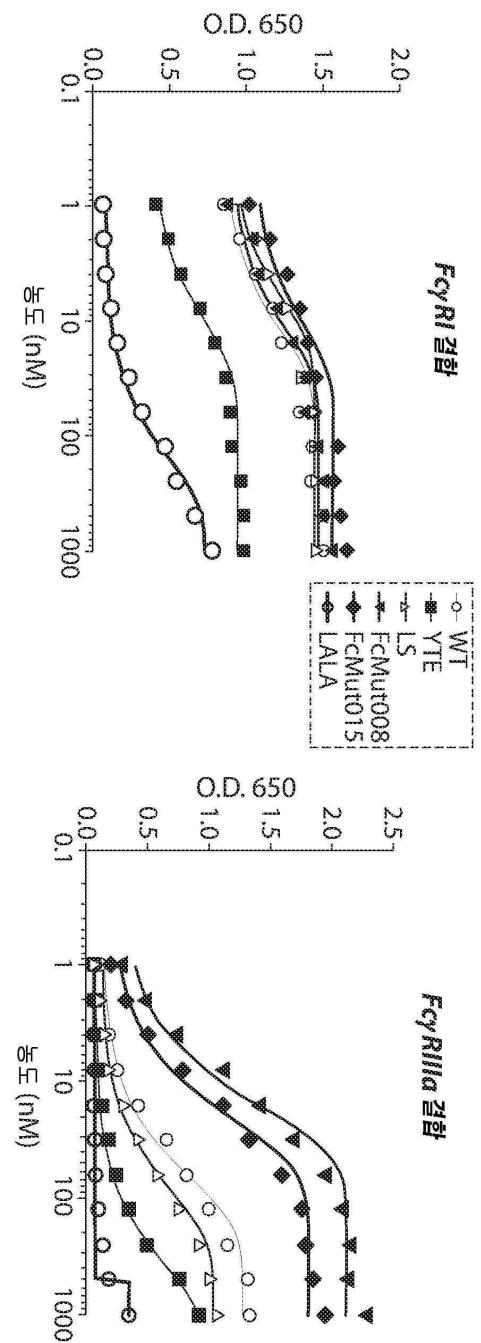
도면6



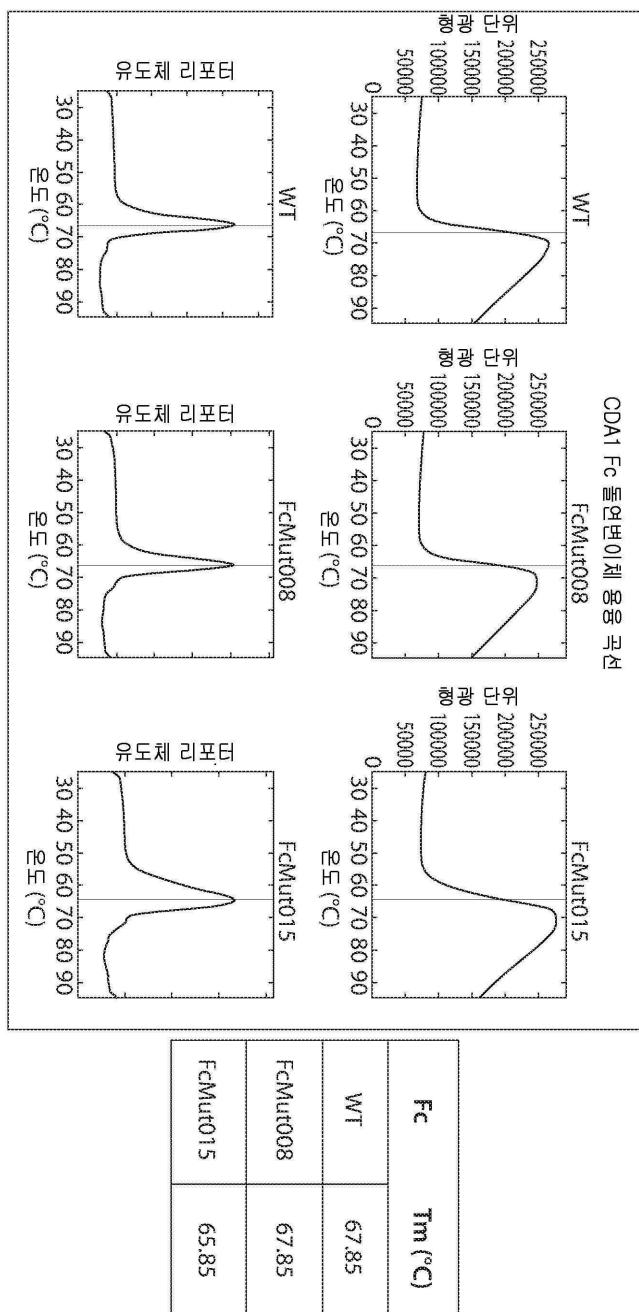
도면7



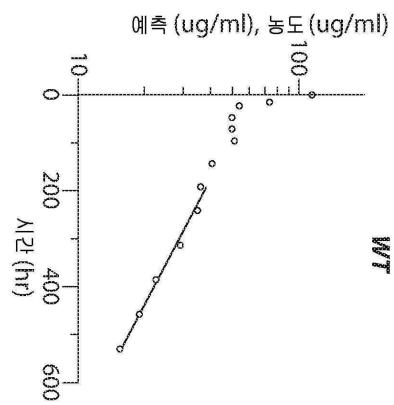
도면8



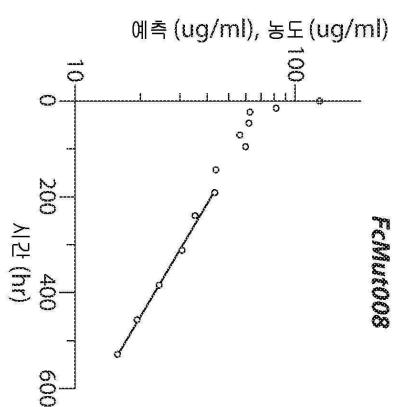
도면9



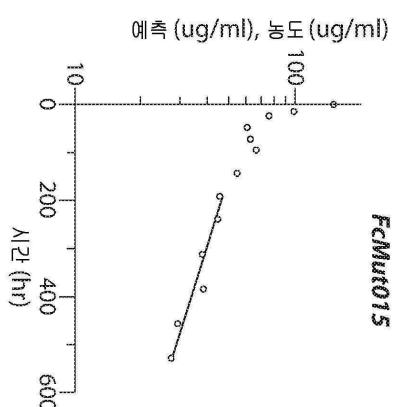
도면10



WT



FcMut008

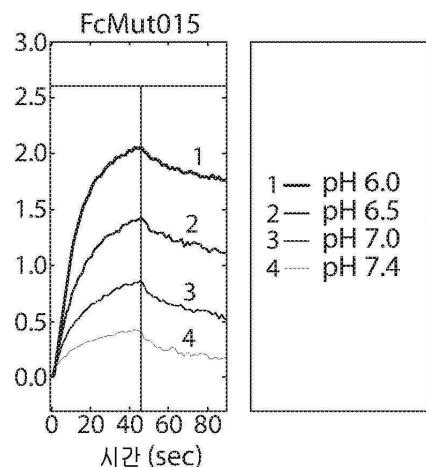


FcMut015

도면11a

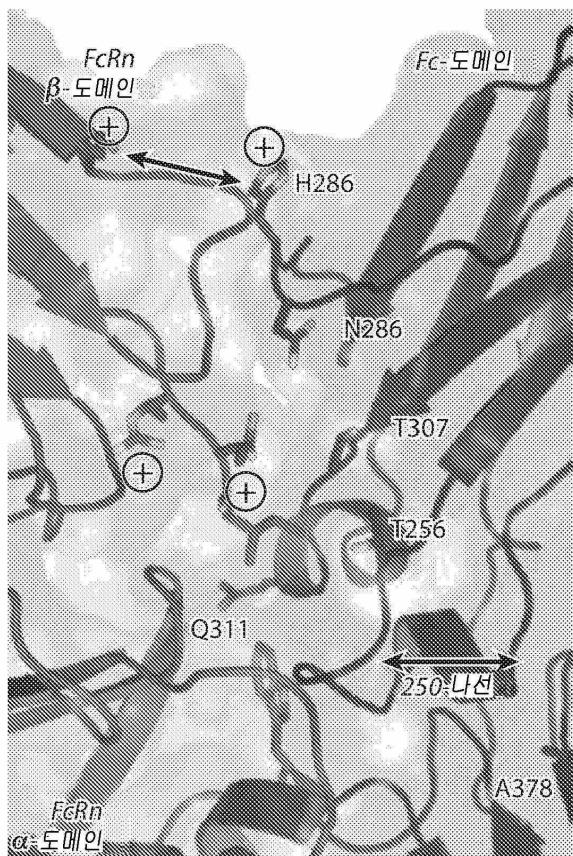
명칭	돌연변이	k_d (감소 배수*)	k_{on} (증가 배수*)	k_{off} (감소 배수*)
FcMut229	T256D_H285D_T307R_Q311V_A378V	14.0	3.7	3.7
FcMut213	H285D_T307Q_A378V	13.2	3.8	3.3
FcMut215	T307Q_Q311V_A378V	12.4	3.4	3.7
FcMut228	T256D_N286D_T307R_Q311V_A378V	12.4	3.2	4.0
FcMut227	T256D_H285D_N286D_T307R_A378V	11.6	3.6	3.2
FcMut183	T256D_Q311V_A378V	11.0	3.2	3.2
FcMut223	T256D_H285D_A378V	10.3	3.7	2.7
FcMut216	H285D_Q311V_A378V	9.6	3.4	2.8
FcMut186	T256D_T307R_Q311V_A378V	9.5	2.9	3.1
FcMut197	H285N_T307Q_N315D	9.1	2.9	3.0
FcMut171	T256D_N286D_T307R_Q311V	8.5	2.5	3.1
FcMut219	T256D_N315D_A378V	7.9	2.8	2.8
FcMut045	T256D_T307R_Q311V	5.9	2.3	2.6
WT	NONE	1.0	1.0	1.0
YTE (<i>Medimmune</i>)	M252Y_S254T_T256E	8.5	2.3	3.6
LS (<i>Xencor</i>)	M428L_N434S	9.2	2.6	3.6

도면11b



도면11c

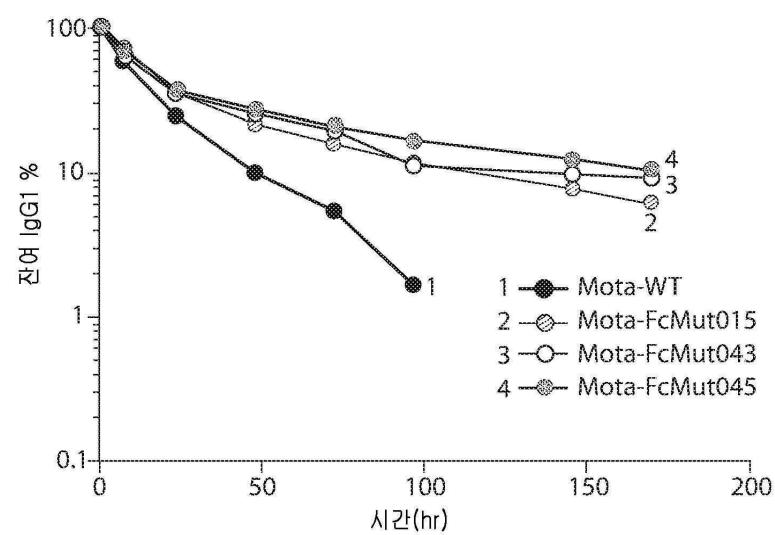
FcRn-Fc 계면



도면12

돌연변이체	TM (시프로 오렌지)	SEC 용리 시간 (min)	Expi293 발현 ($\mu\text{g/mL}$)	SDS-PAGE	단백질 A
WT	68.9	8.5	>80	✓	++
YTE	61.7	8.5	>80	✓	++
LS	68.0	8.5	>80	✓	++
FcMut045	64.8	8.5	>80	✓	++
FcMut171	64.8	8.5	>80	✓	++
FcMut183	64.0	8.5	>80	✓	++
FcMut186	63.7	8.5	>80	✓	++
FcMut197	68.4	8.5	>80	✓	++
FcMut213	70.2	8.5	>80	✓	++
FcMut215	69.2	8.5	>80	✓	++
FcMut216	65.8	8.5	>80	✓	++
FcMut219	66.7	8.5	>80	✓	++
FcMut223	64.3	8.4	>80	✓	++
FcMut227	66.6	8.4	>80	✓	++
FcMut228	66.7	8.5	>80	✓	++
FcMut229	64.6	8.5	>80	✓	++

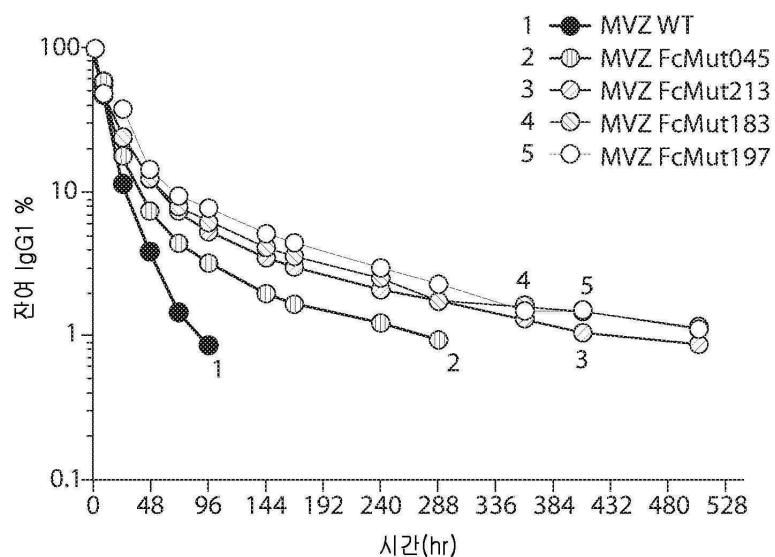
도면13a



도면13b

군	반감기 (hr)	증가 배수	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUC_{inf} ($\text{hr}^*\mu\text{g}/\text{ml}$)	제거 ($\text{ml}/\text{hr}/\text{kg}$)
WT	32		24.4	514.71	3.89
FcMut015	123	3.9	24.7	1168.46	1.71
FcMut045	166	5.2	23.9	1540.65	1.30

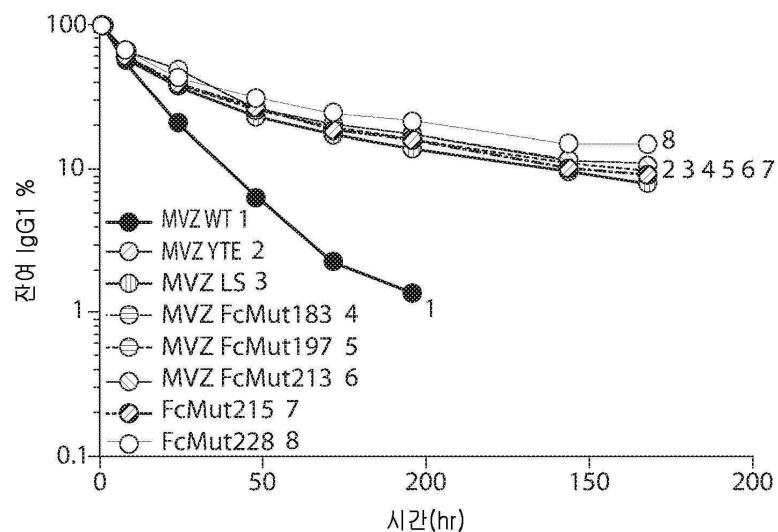
도면14a



도면14b

군	반감기 (hr)	증가 배수	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUC_{inf} ($\text{hr}^*\mu\text{g}/\text{ml}$)	제거 ($\text{ml}/\text{hr}/\text{kg}$)
WT	19		101.5	1343.13	3.72
FcMut045	135	7.0	112.3	2374.28	2.11
FcMut183	192	9.9	95.4	3216.24	1.55
FcMut197	165	8.6	81.7	3074.29	1.63
FcMut213	182	9.4	107.2	3408.52	1.47

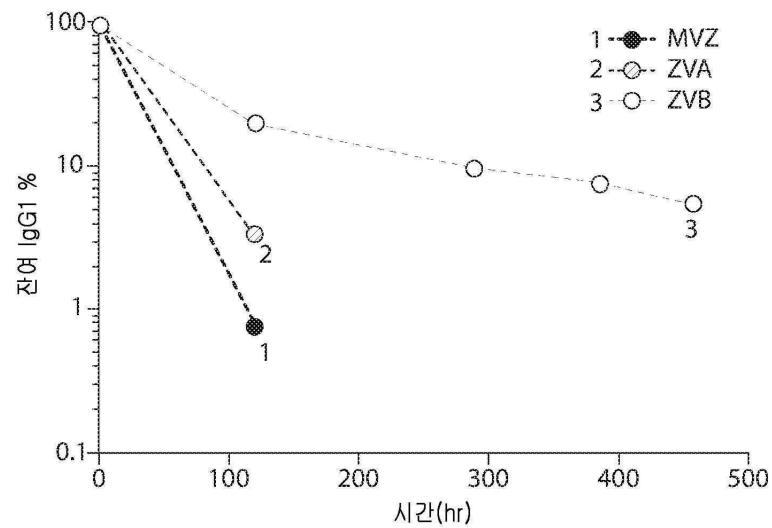
도면14c



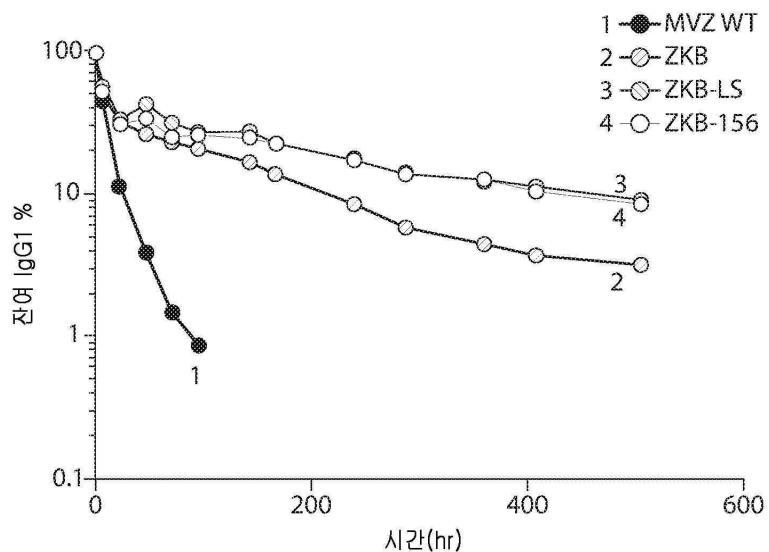
도면14d

군	반감기 (hr)	증가 배수	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUC_{inf} ($\text{hr}^*\mu\text{g}/\text{ml}$)	제거 ($\text{ml}/\text{hr}/\text{kg}$)
WT	22		29.3	513.87	3.89
YTE	86	3.9	26.3	1302.33	1.54
LS	87	4.0	30.6	1482.35	1.35
FcMut183	90	4.1	24.9	1384.34	1.44
FcMut197	94	4.3	22.0	1191.66	1.68
FcMut213	96	4.4	21.4	1286.27	1.55
FcMut215	87	4.0	27.3	1395.92	1.43
FcMut228	123	5.6	20.1	1509.50	1.32

도면15



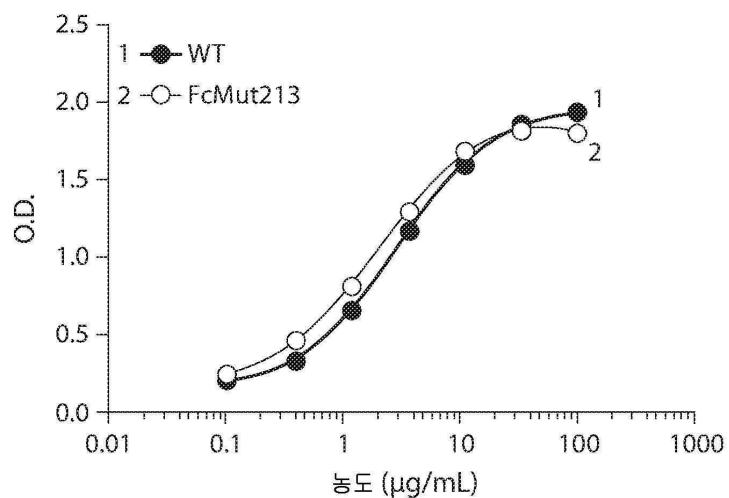
도면16



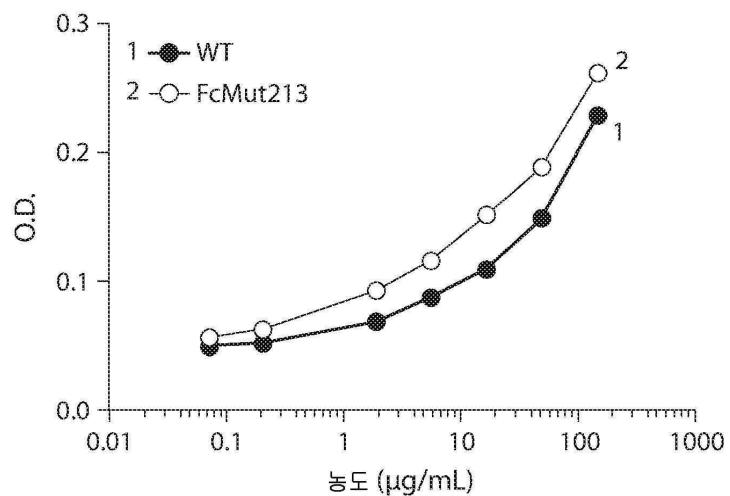
도면17a

돌연변이체	Fc γ RI (ELISA)	Fc γ RIIA (옥텟)	Fc γ RIIB (옥텟)	Fc γ RIIIA (ELISA)	C1q (ELISA)
WT	++	++	++	++	++
YTE	+	+	+	+	++
LS	++	++	++	++	++
FcMut045	++	++	++	++	++
FcMut171	+	++	++	++	++
FcMut183	++	++	+++	+++	++
FcMut186	+++	+++	+++	+++	++
FcMut197	++	++	++	+++	+
FcMut213	++	+++	+++	++	++
FcMut215	++	+++	+++	+++	++
FcMut216	++	+++	+++	++	++
FcMut219	++	+++	+++	+++	++
FcMut223	+	+++	+++	++	++
FcMut227	+	+++	+++	++	+
FcMut228	+	+	++	++	++
FcMut229	++	+++	+++	++	++

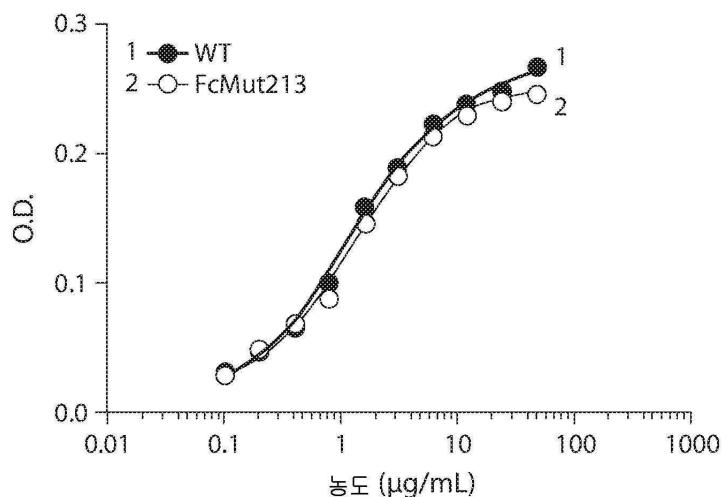
도면17b



도면17c



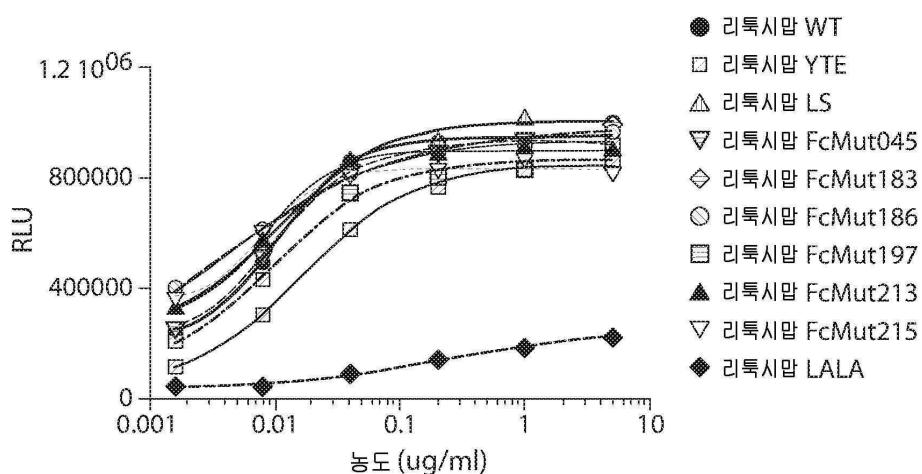
도면17d



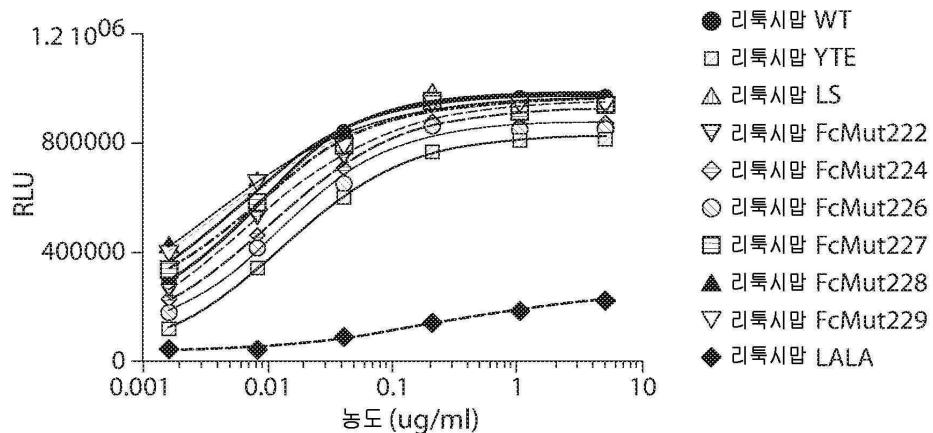
도면18

항체	돌연변이	CDC EC50 (ug/mL)*	C1q 결합
RTX WT	없음	0.715	0.87
RTX YTE	M252Y_S254T_T256E	> 20	1.05
RTX LS	M428L_N434S	0.352	1.05
RTX FcMut045	T256D_T307R_Q311V	0.353	0.87
RTX FcMut183	T256D_Q311V_A378V	0.103	1.36
RTX FcMut186	T256D_T307R_Q311V_A378V	0.158	0.51
RTX FcMut197	H285N_T307Q_N315D	2.543	0.49
RTX FcMut213	H285D_T307Q_A378V	0.267	1.09
RTX FcMut215	T307Q_Q311V_A378V	0.141	1.03
RTX FcMut222	T256D_T307Q_Q311V	0.577	0.94
RTX FcMut224	T256D_H285D_T307R_Q311V	0.576	0.82
RTX FcMut226	T256D_H285D_N286D_T307ER_Q311V	0.745	0.79
RTX FcMut227	T256D_H285D_N286D_T307R_A378V	0.228	0.99
RTX FcMut228	T256D_N286D_T307R_Q311V_A378V	0.220	0.89
RTX FcMut229	T256D_H286D_T307R_Q311V_A378V	0.140	1.29
RTX LALA	L234A_L235A	> 20	NA
RTX FcMut037	L235V_G236A	> 20	NA

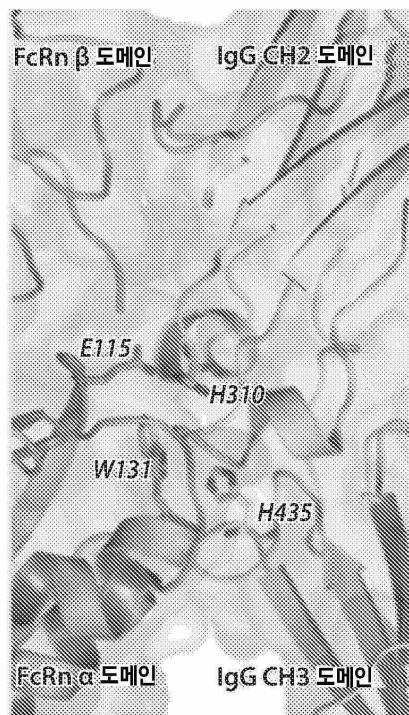
도면19a



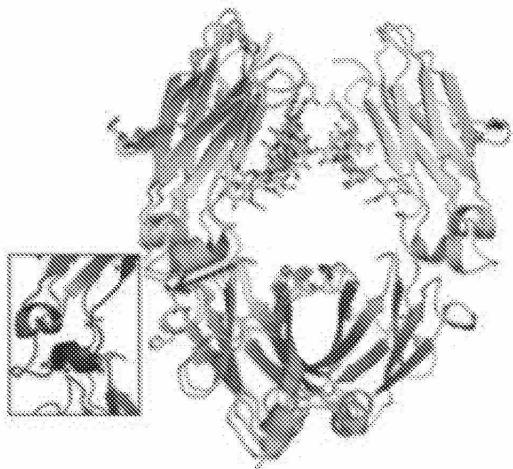
도면19b



도면20a



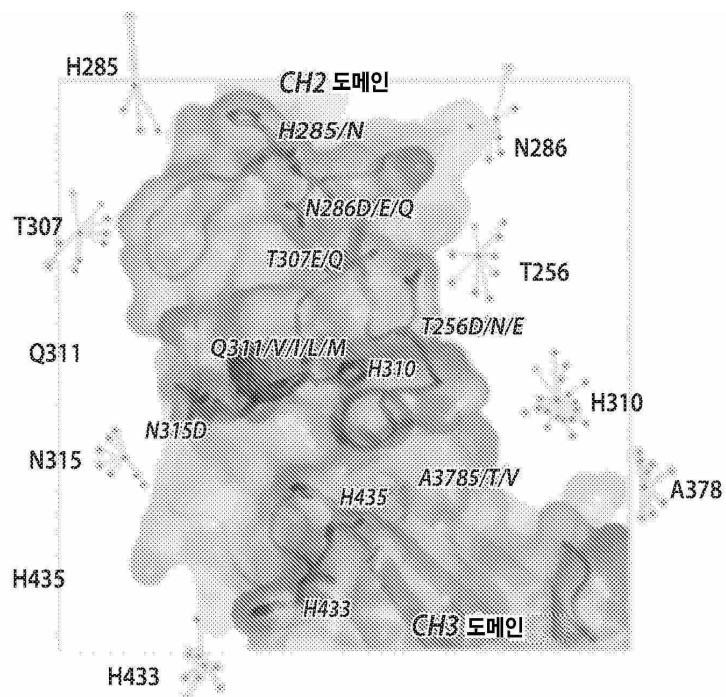
도면20b



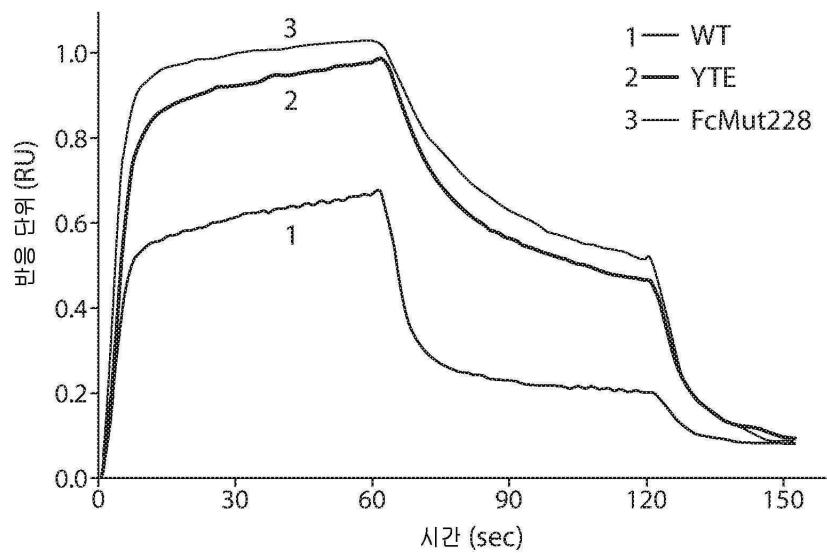
도면21a

세트	아미노산
접촉 잔기	L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435, Y436
말초 잔기	M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286, K288
비접촉 잔기	A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430, A431
250-나선 역학을 조절하는 잠재성을 갖는 잔기	P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306, H427

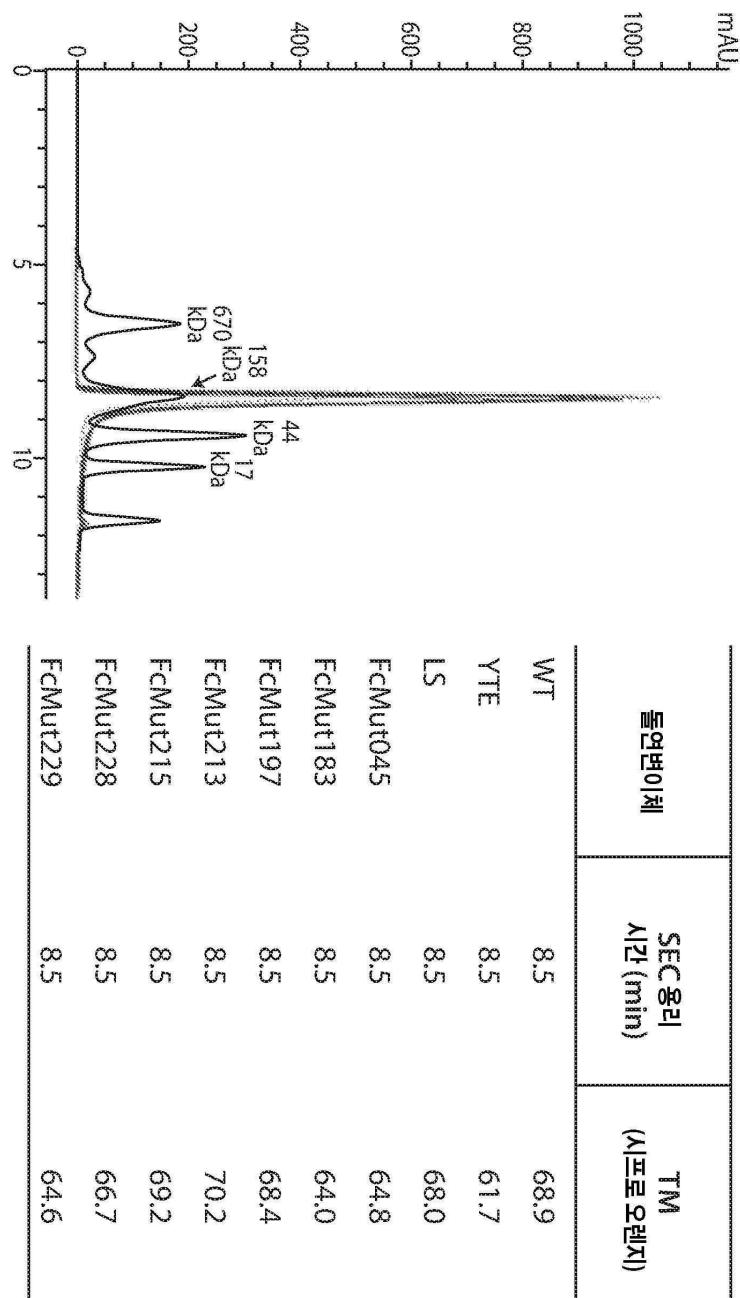
도면21b



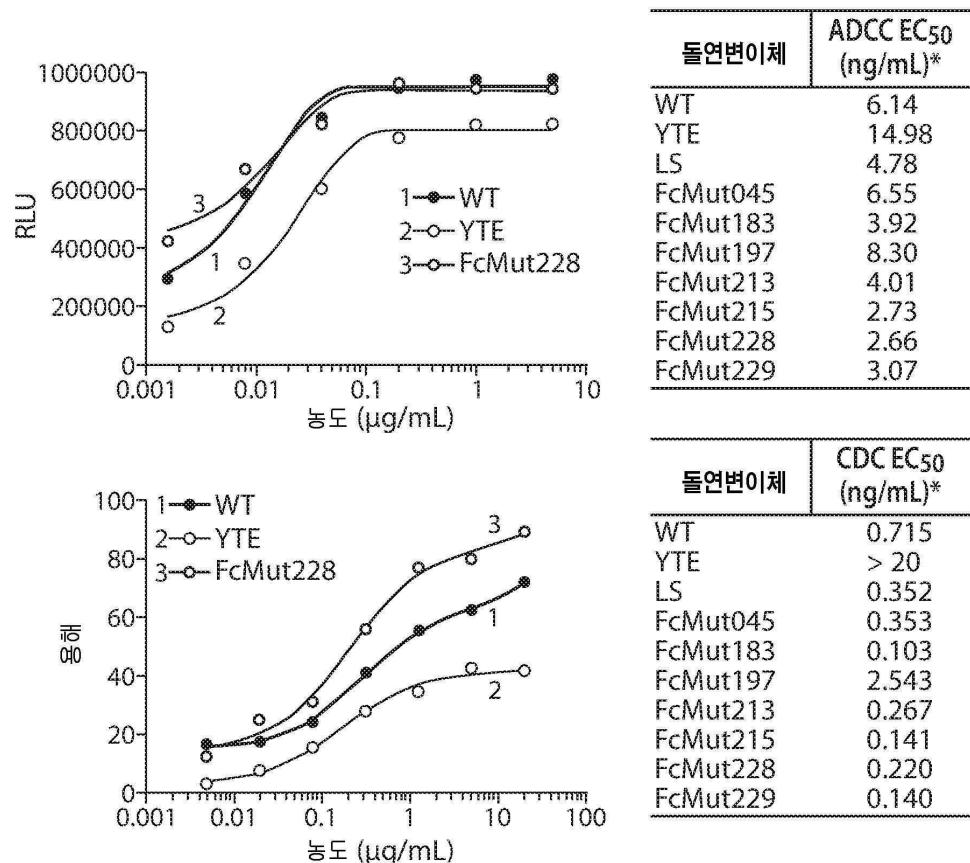
도면22



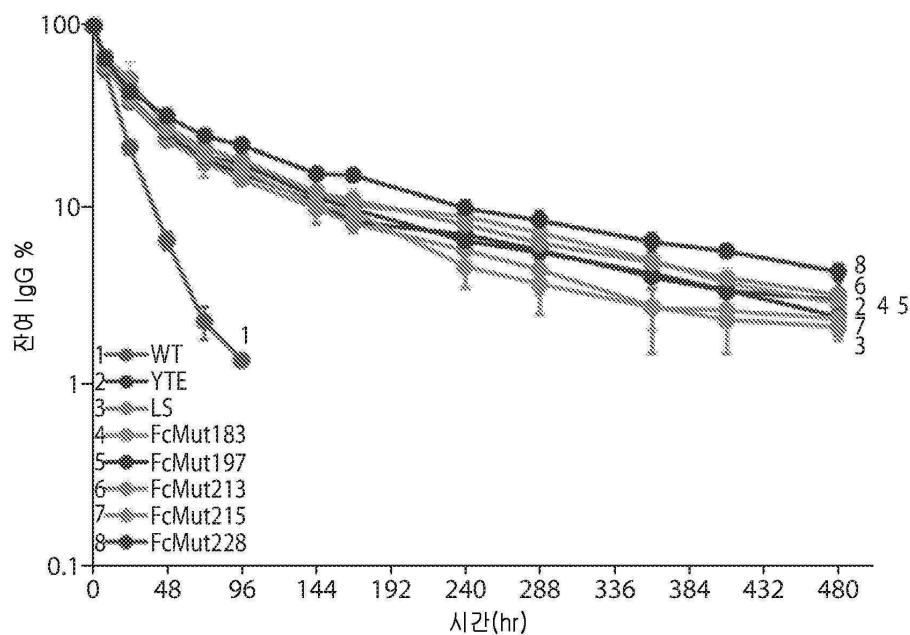
도면23



도면24



도면25a



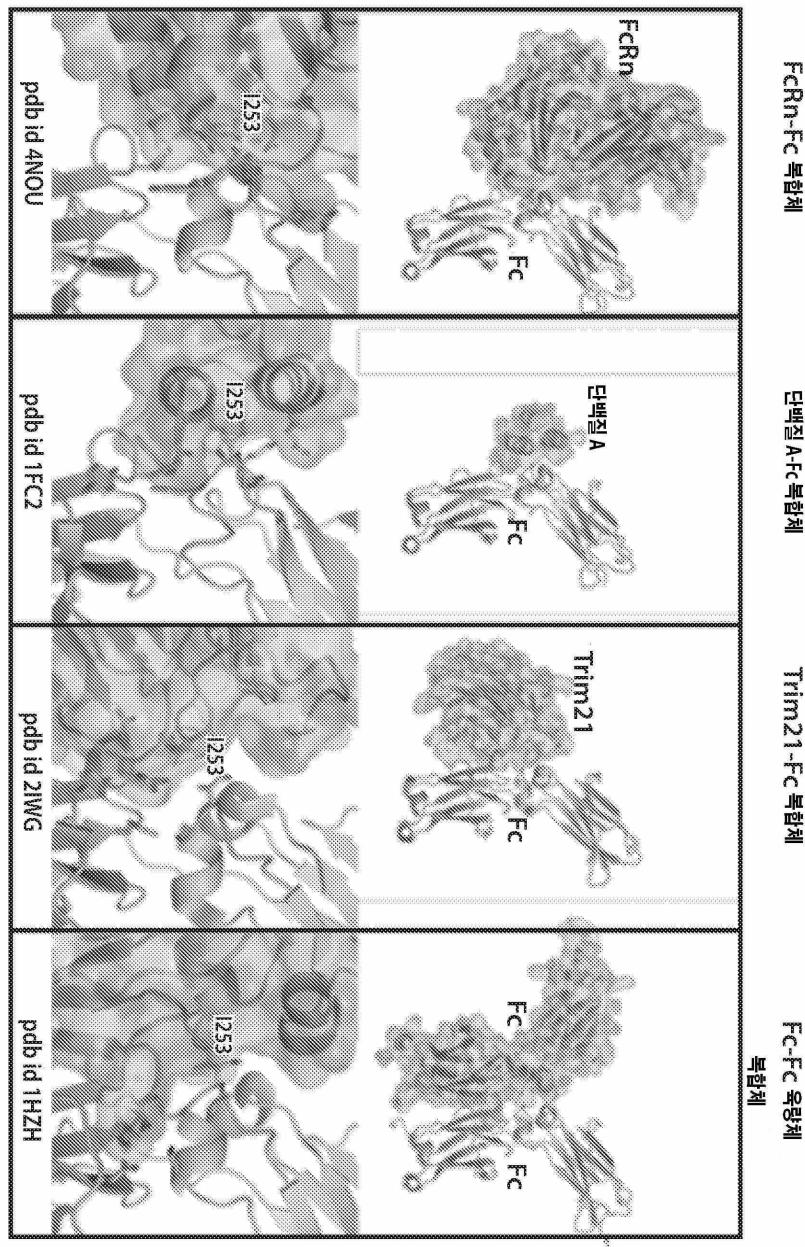
도면25b

군	반감기 (hr)	증가 배수	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUC_{inf} ($\text{hr}^*\mu\text{g}/\text{ml}$)	제거 ($\text{ml}/\text{hr}/\text{kg}$)
WT	22		29.3	513.87	3.89
YTE	193	8.8	26.3	1682.46	1.19
LS	167	7.6	30.6	1731.27	1.16
FcMut183	145	6.6	24.9	1689.29	1.18
FcMut197	170	7.8	22.0	1385.48	1.44
FCMut213	184	8.4	21.4	1546.14	1.29
FcMut215	220	10.1	27.3	1587.99	1.26
FcMut228	207	9.5	20.1	1741.26	1.15

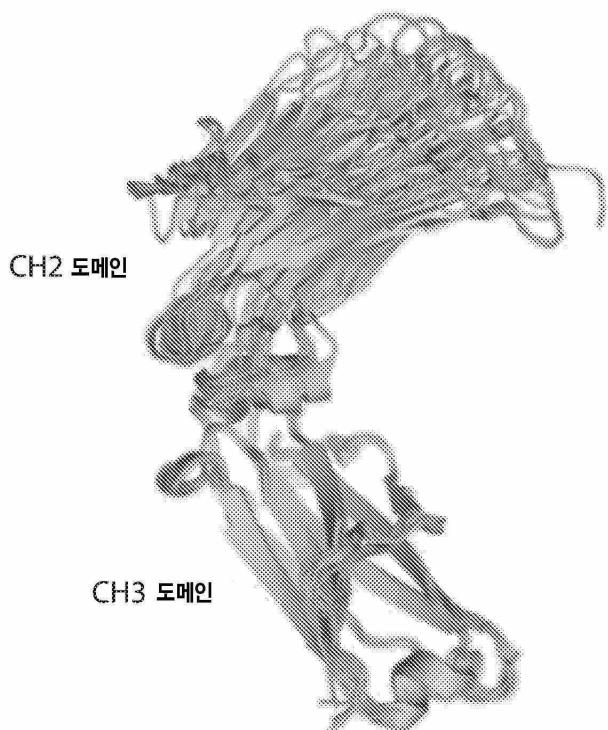
도면26

Fab	Fc	돌연변이체	EC50 (ug/mL)
모티비주맙	WT	없음	8.50
모티비주맙	YTE	M252Y_S254T_T256E	10.09
모티비주맙	LS	M428L_N434S	14.49
모티비주맙	FcMut045	T256D_T307R_Q311V	7.73
모티비주맙	FcMut183	T256D_Q311V_A378V	7.41
모티비주맙	FcMut197	H285N_T307Q_N315D	12.32
모티비주맙	FcMut213	H285D_T307Q_A378V	10.54
모티비주맙	FcMut215	T307Q_Q311V_A378V	7.80
모티비주맙	FcMut228	T256D_N286D_T307R_Q311V_A378V	10.45

도면27a



도면27b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> VISTERRA, INC.

<120> ENGINEERED POLYPEPTIDES AND USES THEREOF

<130> P2029-7014W0

<140><141><150> 62/485,671

<151> 2017-04-14

<150> 62/370,201

<151> 2016-08-02

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 6xHis tag"

<400> 2

His His His His His

1 5